

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**DISC-ELEKTROPHORETISCHE UND HISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNG DER SAUREN PHOSPHATASE UND
LACTATDEHYDROGENASE EXPERIMENTELLER
DARMTUMOREN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Georg Brox
aus Leipzig

Mainz 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Disc-elektrophoretische und histochemische
Untersuchung der sauren Phosphatase und
Lactatdehydrogenase experimenteller Darmtumoren

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Georg B r o x
aus Leipzig

Mainz 1976

Fachbereichsdekan: Professor Dr.R. Wolf

Referent: Professor Dr.A. Schäfer

Korreferent: Professor Dr.H. Bredt



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	
a) Experimentelle Erzeugung von Darmtumoren	1
b) Eigenschaften und Funktion der untersuchten Enzyme	5
2. <u>Material und Methoden</u>	
a) Tiermaterial und Tumorinduktion	9
b) Histochemische Methoden	10
c) Disc-elektrophoretische Methoden	14
3. <u>Ergebnisse</u>	
a) Verteilung und makroskopische Pathologie der Tumoren	22
b) Mikroskopische Pathologie der experimentell erzeugten Darmtumoren	25
c) Verteilung und histologische Klassifizierung der elektrophoretisch und histologisch untersuchten Tumoren	26
d) Disc-Elektrophorese und Enzymhistochemie	28
Saure Phosphatase	28
1. Disc-elektrophoretische Auftrennung in der normalen Schleimhaut	28
2. Disc-elektrophoretische Auftrennung in Darmtumoren	31
3. Histochemische Darstellung der sauren Phosphatase	34
a) Normale Schleimhaut	34
b) Histochemische Darstellung der sauren Phosphatase in den Darmtumoren	35
Lactatdehydrogenase	36
1. Disc-elektrophoretische Auftrennung in der normalen Schleimhaut	36
2. Disc-elektrophoretische Auftrennung in Darmtumoren	36
3. Histochemische Darstellung der Lactatdehydrogenase	40
a) Normale Schleimhaut	40
b) Histochemische Darstellung der LDH in den Darmtumoren	40
4. <u>Diskussion</u>	42
5. <u>Zusammenfassung</u>	50
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	52
7. <u>Lebenslauf</u>	67

Einleitung

Die Bedeutung der Kunst im Leben

Die Kunst ist eine der wichtigsten Säulen des menschlichen Lebens. Sie ist eine Sprache, die über alle Grenzen hinweg verstanden werden kann. In der Kunst finden wir die Reflexion unserer Existenz, unsere Hoffnungen und Ängste. Sie ist ein Spiegelbild unserer Seele, das uns hilft, uns selbst und die Welt um uns herum besser zu verstehen. Die Kunst ist nicht nur ein Hobby, sondern eine Lebenshaltung. Sie ist eine Art, die uns verbindet und uns ermöglicht, unsere Gedanken und Emotionen auszudrücken. In der Kunst finden wir die Freiheit, unsere Fantasie zu entfalten und unsere Grenzen zu überschreiten. Sie ist eine Art, die uns hilft, die Welt aus einer neuen Perspektive zu sehen und uns selbst zu entdecken. Die Kunst ist eine Sprache, die uns hilft, unsere Gedanken und Emotionen auszudrücken. Sie ist eine Art, die uns verbindet und uns ermöglicht, unsere Grenzen zu überschreiten. In der Kunst finden wir die Freiheit, unsere Fantasie zu entfalten und unsere Grenzen zu überschreiten. Sie ist eine Art, die uns hilft, die Welt aus einer neuen Perspektive zu sehen und uns selbst zu entdecken.

Meiner lieben Frau gewidmet

Die Kunst ist eine Sprache, die uns hilft, unsere Gedanken und Emotionen auszudrücken. Sie ist eine Art, die uns verbindet und uns ermöglicht, unsere Grenzen zu überschreiten. In der Kunst finden wir die Freiheit, unsere Fantasie zu entfalten und unsere Grenzen zu überschreiten. Sie ist eine Art, die uns hilft, die Welt aus einer neuen Perspektive zu sehen und uns selbst zu entdecken. Die Kunst ist eine Sprache, die uns hilft, unsere Gedanken und Emotionen auszudrücken. Sie ist eine Art, die uns verbindet und uns ermöglicht, unsere Grenzen zu überschreiten. In der Kunst finden wir die Freiheit, unsere Fantasie zu entfalten und unsere Grenzen zu überschreiten. Sie ist eine Art, die uns hilft, die Welt aus einer neuen Perspektive zu sehen und uns selbst zu entdecken. Die Kunst ist eine Sprache, die uns hilft, unsere Gedanken und Emotionen auszudrücken. Sie ist eine Art, die uns verbindet und uns ermöglicht, unsere Grenzen zu überschreiten. In der Kunst finden wir die Freiheit, unsere Fantasie zu entfalten und unsere Grenzen zu überschreiten. Sie ist eine Art, die uns hilft, die Welt aus einer neuen Perspektive zu sehen und uns selbst zu entdecken.

1. Einleitung

a) Experimentelle Erzeugung von Darmtumoren

Über die experimentelle Erzeugung von Darmtumoren wurde in den letzten Jahren in einer großen Anzahl von Veröffentlichungen berichtet. Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Spezies (hauptsächlich jedoch an Nagetieren) und mit unterschiedlichen carcinogenen Substanzen durchgeführt. Bei diesen Verbindungen handelte es sich meistens um Nitrosamine und deren Derivate. Die cancerogenen Substanzen können auf unterschiedliche Weise appliziert werden: oral mit dem Trinkwasser oder der Nahrung, intraperitoneal sowie durch subcutane Injektion. SCHOENTAL (1969) applizierte Methyl-N-Nitroso-N-Nitroguanidin intraperitoneal und Äthyl-N-Nitroso-N-Nitroguanidin intragastral und beobachtete bei der Ratte Darmcarcinome. YAMADA (1971) verabreichte Ratten eine Nahrung, die zu 0,025 % 2,7-Fluorenylenbisacetamid enthielt. Hauptangriffspunkt dieses Carcinogens ist die Leber, zusätzlich entstehen jedoch bei 50 % der Versuchstiere Darmtumoren. Makroskopisch handelte es sich dabei überwiegend um polypöse Tumoren, histologisch um Adenocarcinome mit unterschiedlicher Differenzierung.

SCHREIBER (1972) erzeugte mit einer intragastral verabreichten Dosis von 25 mg Methylnitrosoharnstoff/kg Körpergewicht bei Ratten hauptsächlich Magentumoren; es handelte sich dabei überwiegend um Plattenepithelcarcinome des Vormagens. Nur zu einem kleinen Prozentsatz (4,3 %) gelang die Induktion von Darmtumoren; in der Mehrzahl Adenocarcinome und Sarkome des Dickdarms. Mit den angeführten cancerogenen Stoffen entwickelten sich nur bei einem Teil der Versuchstiere und erst nach längerer Einwirkungszeit (9 Monate bis 2 Jahre) Darmtumoren.

Erst seit der Mitteilung von DRUCKREY u. Mitarb. (1967) steht mit 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) eine carcinogene Substanz zur Verfügung, die bei parenteraler (subcutan oder peroraler) Applikation nach einer durchschnittlich sechsmonatiger Latenzzeit bei nahezu sämtlichen Versuchstieren multiple Carcinome und adenomatöse Polypen im Intestinaltrakt induziert. Die Tumorinduktion bei Ratten, Hamstern und Mäusen mit DMH, wie sie von SCHAUER u. Mitarb. (1969), WIEBECKE u. Mitarb. (1969) und OSSWALD und KRÜGER (1969) berichtet werden, bestätigt diese Erfahrung.

Die natürliche Variante des in der Natur nicht vorhandenen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) ist das hauptsächlich auf der Insel Guam und in Japan vorkommende Cycasin. Dieses läßt sich aus den Samen der Cycaden-Nüsse, aus den Wurzeln und aus den Blättern der *Cycas circinalis* (Guam) und der *Cycas revoluta* (Japan) extrahieren. Diese palmähnlichen Pflanzen gehören zur Familie der Cycadaceae und sind in tropischen und subtropischen Gebieten der Erde zu finden. In einigen Teilen der Welt (insbesondere auf Guam) wird der Samen dieser Pflanzen immer noch als Hauptnahrungsquelle verwendet. Daher waren besonders bei Eingeborenen der Insel Guam die toxischen Eigenschaften der Samen lang vor deren chemischen Identifikation genau bekannt. Diese äußerten sich bei der betroffenen Bevölkerung in Lähmungen der peripheren Nerven. Das Krankheitsbild ähnelt der amyotrophen Lateralsklerose. Außerdem traten bei Eingeborenen häufig Leberfunktionsstörungen auf sowie primäre Lebercarcinome (WHITING 1963, LAQUEUR 1965, WOOD 1967, SPATZ 1967, SCHMÄHL 1970).

Tierversuche an Ratten ergaben, daß die Samen der Cycaden Leber- sowie Nierentumoren induzierten (LAQUEUR u. Mitarb. 1963 u. 1965). LAQUEUR und seine Mitarbeiter berichteten ebenfalls von Darmtumoren, die sich im Dickdarm

entwickelten und bei denen es sich hauptsächlich um teils flach, teils polypös wachsende Adenocarcinome handelte. Die Latenzzeit bis zum Auftreten der Geschwülste betrug 188 bis 250 Tage. Nach intraperitonealer Injektion des aus dem Cycasin gewonnenen Aglycon (Methylazoxymethanol) fanden sich bei den Ratten auch gehäuft Carcinome des Duodenum.

SPRINGER u.Mitarb. (1970) verabreichten Ratten eine wöchentliche Dosis DMH (21 mg/kg Tiergewicht) durch subcutane Injektion. Nach 8 bis 16 Wochen zeigten sich die ersten tumorösen Veränderungen in Dick- und Dünndarm in Form von adenomatösen Polypen, daneben ließen sich aber auch schon die ersten, noch weitgehend auf die Mukosa begrenzten Carcinome nachweisen. Zu gleichen Ergebnissen kamen eine Reihe weiterer Untersuchungen an Ratten (WEISBURGER 1971, WITTING 1971 und POZHARISSKIJ 1972) und an Mäusen (PEGG 1971, TOTH 1972 und EVANS u.Mitarb. 1972) mit Dosierungen zwischen 7,21 bis 40 mg/kg Tiergewicht.

Der Wirkungsmechanismus des DMH wurde von LAQUEUR (1965), DRUCKREY (1965), WITTKOP (1969), WITTING (1971) und BURDETTE (1971, 1974) untersucht. Dabei stellte LAQUEUR (1965) fest, daß das Cycasin (Methylazoxymethanol- β -D-Glucosid) noch nicht das endgültige Cancerogen sein konnte, da es nur bei peroraler, nicht jedoch bei parenteraler Applikation seine Wirkung entfaltet. Auch an keimfrei aufgezogenen Versuchstieren kann bei oraler Applikation des Cycasin kein Tumor im Darmtrakt erzeugt werden, da erst durch Einwirkung der β -Glucuronidase, die insbesondere von im Darm angesiedelten Bakterien produziert wird, von Cycasin dessen hochwirksames Aglycon abgespaltet wird. Das Aglycon des Cycasin stellt die eigentliche carcinogene Substanz dar.

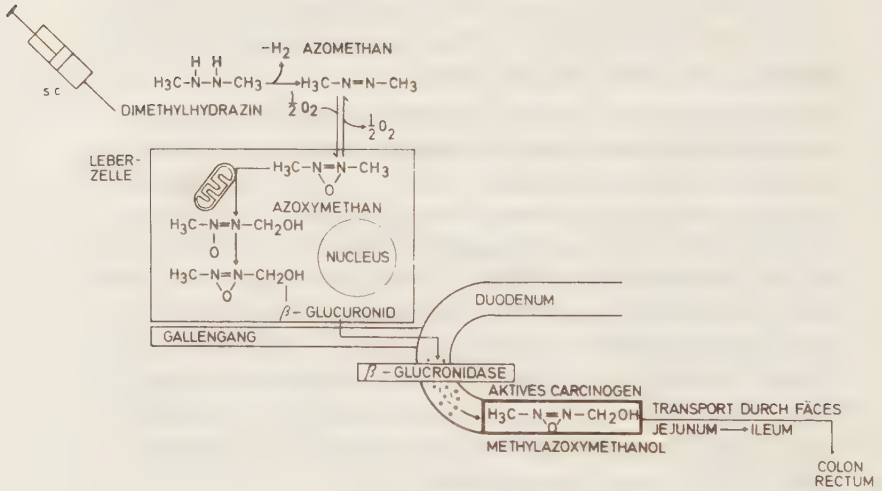


Abb. 1: Metabolisierungsweg des Dimethylhydrazin nach BURDETTE und WITTING (1971 u. 1974).

BURDETTE und WITTING (1971 u. 1974) verfolgten den Metabolismus des DMH (Abb.1). Nach subcutaner Applikation wird DMH dehydriert, dabei entsteht Azomethan. Das Azomethan gelangt in die Leberzelle, wo es an den Mitochondrien zu Azomethan oxidiert (WITTKOP u. Mitarb. 1969) und in einen Alkohol umgewandelt wird (Methylazoxymethanol). Dieser Alkohol kann nun mit Glucuronsäure in β -Stellung verestert und mit der Galle in das Duodenum ausgeschieden werden. Bakterien der Darmflora, die das Enzym β -Glucuronidase enthalten, trennen aus dieser Verbindung Methylazoxymethanol ab, das durch Dehydrierung ein Alkylradikal entläßt und weiter spontan in molekularen Stickstoff, in Wasser und Formaldehyd zerfällt.

Die oben zitierten Autoren nehmen an, daß das freige-wordene Radikal über eine Methylierung von Nuclein-säuren auf die Epithelien der Darmschleimhaut einwirkt. Dabei fungieren Speisebrei und Kot als Vehikel der cancerogenen Substanz, die auch in weiter anal gelegene Darmabschnitte transportiert wird und auch hier Tumoren induzieren kann.

b) Eigenschaften und Funktion der untersuchten Enzyme
Saure Phosphatase (unspezifische, saure Phospho-
monoesterase; s.Ph.) (E.C. 3.1.3.2.)

Die saure Phosphomonoesterase kann histochemisch mit einer Metallsalzmethode GOMORI (1950) und mit Azofarb-stoff-Kupplungsreaktionen (BURSTONE 1958, BARKA und ANDERSON 1962) nachgewiesen werden. Sie gilt seit den zahlreichen Untersuchungen der Arbeitsgruppe um DE DUVE (Übersichtsarbeiten DE DUVE 1963, 1964) und STRAUSS (1967) als lysosomales Leitenzym; dieses insbesondere auch seit den elektronenmikroskopisch-histochemischen Untersuchungen der Darmschleimhautepithelien (HUGON u.

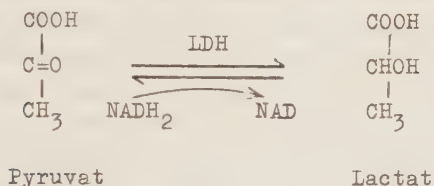
BORGERS 1967, 1968; MILLINGTON u. BROWN 1967; BEADLE u.Mitarb.1971). In den Epithelien der Darmschleimhaut finden sich aber auch Aktivitäten der sauren Phosphatase in geringem Ausmaß im Bürstensaum, Golgi-Apparat und in den Zellmembranen (SHNITKA 1960, OGAWA 1962, JERVIS 1963, BARKA 1964, RIECKEN u.Mitarb. 1965, 1967; IWAI 1969, HUGON u. CHARUEL 1971).

Die Funktionen der sauren Phosphatase sind noch nicht vollständig geklärt. So soll dieses Enzym eine wichtige Funktion beim physiologischen Abbau der Darmepithelien spielen (BAXTER-GRILLO 1970). Bei Erkrankungen oder experimentellen Eingriffen, die zu Nekrose oder degenerativen Zellveränderungen führen, läßt sich eine Steigerung der Enzymaktivität feststellen (TAPPEL 1962, ZALKIN 1962, RIECKEN u.Mitarb. 1966, HUGON u. BORGERS 1966, MELLORS 1967, TAPPEL u.Mitarb. 1967, MEIJER 1972). Über die Bedeutung der sauren Phosphatase bei resorptiven Vorgängen der Epithelzelle läßt sich nur schwer etwas aussagen. So beobachtete BARKA (1963, 1964) nach Fettfütterungen einen Abfall der Enzymaktivität in den Lysosomen der Darmepithelien. Insbesondere scheint die saure Phosphatase bei der Resorption von Nahrungsbestandteilen durch Pino- und Phagozytose eine Funktion zu besitzen. Diese Form der Resorption findet sich hauptsächlich bei neugeborenen Tieren (BEHNKE 1962, TRIER u. RUBIN 1965, WISSIG u. GRANEY, CORNELL u. PADYKULA 1968, WILLIAMS u. BECK 1969).

Mit physikalisch-chemischen Trennungsverfahren (z.B. elektrophoretischen Methoden), aber auch mit histochemischen Methoden konnten verschiedene Fraktionen der sauren Phosphatase isoliert werden (LI u.Mitarb. 1970, REIF u.Mitarb. 1973). Dabei konnten in menschlichen Darmhomogenaten mit elektrophoretischen Untersuchungsmethoden zwei Aktivitätsformen der sauren Phosphatase nachgewiesen werden (FRIC u.Mitarb.1968, LOJDA u.Mitarb. 1970).

Lactatdehydrogenase (L-Lactat-NAD-Oxireductase; LDH)
(E.C. 1.1.1.27)

Die Lactatdehydrogenase ist ein substratspezifisches Enzym mit ubiquitärer Verbreitung im Organismus. Als Oxidoreduktase katalysiert die LDH glykolytisch die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat.



Bei der anaeroben Glykolyse wird Pyruvat zu Lactat abgebaut, während bei der oxidativen Metabolisierung Pyruvat zu CO_2 und H_2O abgebaut wird. MARKERT (1963) stellte fest, daß wahrscheinlich die grundlegende Funktion der LDH darin besteht, das Verhältnis von NAD/NADH_2 zu regulieren. Dieser Quotient ist für zahlreiche biochemische Reaktionen in der Zelle von entscheidender Bedeutung.

Schon 1943 wurde beobachtet, daß die LDH verschiedener Spezies unterschiedliche chemische, physikalische und immunologische Eigenschaften aufwiesen, obwohl alle LDH-Formen die oben genannte Reaktion katalysieren (WARBURG, CHRISTIAN u. BONNICHSEN 1943). Für die multiplen Formen der LDH, die bei gleichen katalytischen Eigenschaften unterschiedliche Strukturen aufweisen, wurde 1959 von MARKERT und MÖLLER die Bezeichnung "Isoenzyme" vorgeschlagen. APELLA u. MARKERT (1961) konnten auf Grund ihrer Untersuchungen 2 Grundbausteine der LDH differenzieren; durch Dissoziation des Isoenzym LDH-1 entstanden 4 Untereinheiten gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit (Typ H), bei Trennung der

LDH-5 vier Untereinheiten, die sich in ihrer elektrophoretischen Eigenschaft von denen der LDH-1 unterschied (Typ M). Daraus wurde geschlossen, daß jedes Isoenzym der LDH je aus 4 Untereinheiten der beiden differenten Monomere H und M zusammengesetzt ist. Dabei werden LDH-1 und LDH-5 aus jeweils 4 Untereinheiten des gleichen Monomers aufgebaut, es sind also homogene Tetramere (HHHH bzw. MMMM). LDH-2 (HHHM), LDH-3 (HHMM) und LDH-4 (HMMM) werden hingegen als hybride Formen angesehen, da sie sich aus beiden Monomeren zusammensetzen. Weiterhin unterscheiden sich LDH-1 und LDH-5 in ihrem enzymatischen Verhalten voneinander (PLAGEMANN u.Mitarb. 1960, CAHN u.Mitarb.1962, MARKERT 1963, LINDSAY 1963). So wird LDH-1 mit zunehmender Pyruvatkonzentration gehemmt, während dies bei der LDH-5 erst bei sehr viel höherer Pyruvatkonzentration der Fall ist. Bei höheren Lactatkonzentrationen hingegen werden die anodischen Fraktionen (LDH-1, LDH-2) gehemmt, während die kathodischen Isoenzyme (LDH-5, LDH-4) keine wesentliche Aktivitätshemmung zeigen (BRODY 1964). Daher überwiegt in Organen mit vorwiegend aerobem Stoffwechsel (Herz, Gehirn und Niere) LDH-1 und LDH-2 (KAPLAN und Mitarb. 1968), während in Organen mit hoher anaerober Glykolyserate (z.B. Skelettmuskel) und einer hohen Gewebskonzentration an Lactat LDH-4 und LDH-5 dominieren.

GOODFRIEND u. KAPLAN (1963), CAHN (1963, 1964), DAWSON u.Mitarb. (1964) und GOODFRIEND u.Mitarb. (1966) konnten eine Abhängigkeit der einzelnen Isoenzymaktivitäten von der Sauerstoffspannung in Gewebekulturen beobachten. Bei höherer O_2 -Spannung stellte sich eine höhere Syntheserate von H-Untereinheiten, bei Abfall der Sauerstoffspannung eine erhöhte Bildung von M-Untereinheiten ein.

2. Material und Methoden

a) Tiermaterial und Tumorinduktion

Die Versuche wurden an 150 Ratten eines Wistar-Stammes, aus der Zucht des Pathologischen Institutes der Universität Mainz durchgeführt.

Subcutane Injektion von 1,2-Dimethylhydrazin-Dihydrochlorid(sym.)- der Firma Merck-Schuchart in die Rückenhaut männlicher, erwachsener Tiere (Alter der Tiere: 4 Monate bei Versuchsbeginn) einmal wöchentlich. Die wöchentliche Dosis betrug 21 mg DMH-Base/kg Tiergewicht, die Induktionszeit 180-200 Tage (DRUCKREY u.Mitarb.1969, SPRINGER u.Mitarb. 1970, POZHARISSKIJ 1972). Die Base 1,2-Dimethylhydrazin-Dihydrochlorid (sym.) wurde im Laboratorium der Apotheke der Universität Mainz zur injektionsfertigen Lösung aufgearbeitet (PEGG u. HAWKS 1971 und POZHARISSKIJ 1972):

840 mg DMH-Base ad 100 ml Äthylldiamintetraäthyl-Essigsäure-Lösung (pH 6,5) 0,01 m.

Diese Injektionslösung wurde jeweils am gleichen Wochentag zur gleichen Uhrzeit injiziert. Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter (Altromin R 10 Mischfutter) ad libitum. Um tagesrhythmisch bedingte Schwankungen der Enzymaktivitäten auszuschließen, wurden alle Untersuchungen zur gleichen Tageszeit (16.00h) durchgeführt (SCHÄFER u.Mitarb. 1974). Untersucht wurde jeweils ein tumortragendes Tier und ein unbehandeltes, männliches Kontrolltier von gleichem Alter wie das tumortragende Tier. Den Tumortieren wurde jeweils ein Tumor des Dünndarmes und Dickdarmes entnommen. Waren Metastasen vorhanden, so wurden eine Metastase und ein Darmtumor entnommen. Bei den Kontrolltieren wurden jeweils die der Lokalisation der Tumoren entsprechenden Darmabschnitte mituntersucht. Die Tumoren wurden sorgfältig von Fettgewebe,

Muskel- und Bindegewebe freipräpariert und gründlich mit kalter Ringerlösung (4°C) gereinigt. Daraufhin wurden die Tumoren halbiert. Eine Tumorthälfte wurde für enzymhistochemische und histologische, die andere Hälfte wurde für die disc-elektrophoretische Untersuchung aufbereitet. Es wurden pro Tumor 50 histologische Schnitte angefertigt. Die korrespondierenden Darmabschnitte der Kontrolltiere wurden gleichartig aufgearbeitet.

b) Histochemische Methoden

Saure Phosphatase

Fixation:

1. Wenige Millimeter lange Darm- bzw. Tumor wurde 24h bei 4°C fixiert. Fixiert wurde in einer mit 0,067 m Phosphatpuffer auf pH 7,2 eingestellten und 7,5 % Saccharose enthaltenden 4 %igen Formaldehydlösung. Anschließend wurde das Material 24h in Holtschem Gemisch (HOLT 1959) bei 4°C aufbewahrt.

Holtsches Gemisch:

Saccharose		60,0 g
Gummi arabicum		2,0 g
Aqua dest	ad	200 ml

Danach wurden die Gewebeproben mit Kohlendioxyd-Schnee eingefroren und bei -40°C im Kryostaten geschnitten.
Schnittdicke: 8/ μ .

2. Zu dicke Kryostatschnitte wurden 24h bei 4°C in 4 %iger neutraler Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die fixierten Schnitte in Aqua dest. gespült.

Inkubationslösungen und Durchführung der Inkubation:

1. Bleisalzmethode nach GOMORI (1950)

Inkubationslösung:

Acetatpuffer	0,05 m	pH 5,3	40 ml
Natrium- β -Glycerophosphat	3 %ig		
(Endkonzentration: 0,01 m)			5 ml
Bleiacetat	66,2 mg/5 ml	Aqua dest.	
(Endkonzentration: 0,004 m)			5 ml
		pH 5,3	50 ml

Inkubation: 15-90 Min. bei 37°C

Nachbehandlung der Schnitte:

Spülen in Aqua dest., 1 Minute in 2 %iger Essigsäure bei 22°C nachinkubieren. Spülen in Aqua dest. Farbenentwicklung in 1 %igem Ammoniumsulfid (1-2 Min.). Spülen in Aqua dest. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

2. Methode nach BARKA und ANDERSON (1962)

Inkubationslösung:

Lösung A: Veronal-Acetat(Michaelis)-Puffer

0,05 m	pH 5,0	10,0 ml
10 mg Naphtol-AS-BI-		
Phosphat/1 ml Dimethylfor-		
mamid		2,0 ml

Lösung B: Pararosanilin-HCl

4 %iges Natriumnitrit	1,6 ml
(frisch anzusetzen)	1,6 ml

Lösung A und B mischen und mit 1 n Natronlauge auf pH 5,0 einstellen.

Pararosanilin-HCl: 1g Pararosanilin-HCl (Fuchsin P) in 20 ml Aqua dest. lösen und unter leichtem Erwärmen 5 ml konz. HCl hinzugeben. Nach Abkühlung der Lösung,

filtrieren und die Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahren.

Inkubation: 60 Minuten bei 37°C

Nachbehandlung der Schnitte: Nach der Inkubation die Schnitte in Aqua dest. spülen und mit Glycerin-Gelatine eindecken.

3. Methode nach MEIER-RUGE (1971) modifiziert nach der Methode von BARKA und ANDERSON (1962):

Inkubationslösung:

Lösung A: Natrium-alpha-Naphtylphosphat	80,0 mg
0,9 %iges Natriumchlorid	32,0 ml
Acetatpuffer 0,2 m pH 5,5	8,0 ml

(Diese Lösung kann bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden.)

Lösung B: Pararosanilin-HCl	1,2 ml
4 %iges Natriumnitrit	
(frisch anzusetzen)	1,2 ml
Polyvinylpyrrolidon (MG:24000)	1,4 g

Lösung A und B mischen und mit 1 n Natronlauge auf pH 5,5 einstellen.

Inkubation: 30 Minuten bei 37°C

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua dest. 30 Min. Nachinkubation in 1 %iger Sulfanil-Essigsäure (pH 2-3). Danach in Aqua dest. spülen. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.

Kontrolluntersuchungen:

Bei einigen Tumoren und unbehandelten Tieren wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt.

1. Inkubation der Schnitte in den oben angeführten Lösungen, jedoch ohne Substrat.
2. 30 min. Vorinkubation in 0,01 m L-Cysteinlösung bei pH 5,0 und 5,5; in 0,001 m KCN-Lösung und 0,1 m NaCN-Lösung ebenfalls bei pH 5,0 und 5,5 und 37°C.
3. Inkubationslösungen mit 0,01 m NaF, 0,05 m L-Phenyl-analin und 0,02 m L-Weinsäure.

Lactatdehydrogenase (Pearse 1972)

Vorbehandlung der Schnitte: 8/ μ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen lassen.

Inkubationslösung: Natrium-DL-Lactat 1,0 m (112mg/1ml) 4 ml

NAD ⁺	1,0 m	(735 mg/1 ml)	4 ml
NaCN	0,1 m	(mit 1 n HCl auf pH 7,2 ein- gestellt)	4 ml
MgCl ₂	0,05 m	(507 mg/50 ml)	4 ml
Phosphatpuffer	1/15 m	pH 7,0	10 ml
0,1 %iges Nitro-Bluetetrazolium			10 ml
Aqua dest.			4 ml
		pH 7,2	40 ml

Zu der Inkubationslösung wurde 1,4 g Polyvinylpyrrolidon (MG: ca.24000) zugegeben.

Nachbehandlung der Schnitte: 1 Minute lang in physiologischer Kochsalzlösung spülen. Dann die Schnitte in 10 %iger Formaldehydlösung fixieren. Spülen in Aqua dest. Eindecken der Schnitte mit Glycerin-Gelatine.

c) Disc-elektrophoretische Methoden

Aufarbeitung des Materials:

Saure Phosphatase:

Abwiegen von 0,3 g Tumorgewebe sowie 0,3 g normale Darmschleimhaut.

Zugabe von jeweils 1,66 ml kalter Ringerlösung (4°C).

Lactatdehydrogenase:

Abwiegen von 0,1 g Tumorgewebe und 0,1 g normale Darmschleimhaut.

Zugabe von jeweils 1,66 ml kalter Ringerlösung (4°C).

1 min. Homogenisierung mit einem Teflon R-beschichteten Messerhomogenisator (YANKE & KUNKEL KG, Staufien i.Pr.; Modell: Ultra-Turrax). Das Homogenisat wurde sofort in einem Kühlraum bei 4°C mit 4800 U/min. 10 Minuten zentrifugiert.

Saure Phosphatase:

Es wurden vom klaren Überstand 0,4 ml abpipetiert und mit 3,8 ml 60 %iger Saccharoselösung vermischt.

Lactatdehydrogenase:

0,4 ml Überstand wurden mit 3,8 ml 40 %iger Saccharoselösung vermischt.

Sämtliche Arbeitgänge wurden bei 4°C durchgeführt.

Durchführung der Disc-Elektrophorese:

Gellösungen:

Saure Phosphatase: modifiziert nach WILLIAMS u. REISFELD (1964), KASCHNITZ (1967) u. HÖHN (1971)

Für die elektrophoretische Auftrennung dieses Enzyms wurden Trenngel, Sammelgel sowie Elektrodenpuffer benutzt (Gelsystem Nr.6; nach MAURER 1968):

Trenngel:

<u>Lösung a</u>	HCl 1 n	48 ml
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	6,85 g	
N-N'-N'-N'-Tetramethyläthylendiamin	0,46 ml	
	ad 100 ml H ₂ O	pH 7,5

<u>Lösung b</u>	Acrylamid	30,0 g
N'-N'-Methylenbisacrylamid	0,8 g	
	ad 100 ml H ₂ O	

Lösung c (frisch anzusetzen)

Ammoniumperoxodisulfat	0,14 g	ad 100 ml H ₂ O
------------------------	--------	----------------------------

Zur Herstellung eines 7,5 %igen Trenngels wurden die Lösungen im folgenden Verhältnis gemischt: 1 Teil Lösung a, 2 Teile Lösung b, 1 Teil H₂O, 4 Teile Lösung c.

Sammelgel:

<u>Lösung a</u>	H ₃ PO ₄ 1m	39 ml
Tris(hydroxymethyl)aminoethan	4,95 g	
N-N'-N'-N'-Tetramethyläthylendiamin	0,46 ml	
	ad 100 ml H ₂ O	pH 5,5

<u>Lösung b</u>	Acrylamid	10,0 g
N'-N'-Methylenbisacrylamid	2,5 g	
	ad 100 ml H ₂ O	

<u>Lösung c</u>	Riboflavin	4,0 mg	ad 100 ml H ₂ O
-----------------	------------	--------	----------------------------

<u>Lösung d</u>	Saccharose	60,0 g	ad 100 ml H ₂ O
-----------------	------------	--------	----------------------------

Abkürzungen:

H₂O -für die Herstellung aller Lösungen wurde Ionen-austauscher-Wasser verwendet.

Zur Herstellung eines 2,5 %igen Sammelgels wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt: 1 Teil Lösung a, 2 Teile Lösung b, 1 Teil Lösung c, 4 Teile Lösung d.

Elektrodenpuffer

Diäthylbarbitursäure	5,52 g
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	1,0 g
ad 1000 ml H ₂ O pH 7,0	

Lactatdehydrogenase: modifiziert nach GOLDBERG (1963, 1964, 1965, 1966), DAVIS (1964) und DIETZ u. LUBRANO (1967, 1969)

Gelsystem Nr. 1 (MAURER 1968):

Trenngel:

<u>Lösung a</u>	HCl 1 n	48 ml
Tris(hydroxymethyl)aminomethan		36,6 g
N-N-N'-Tetramethyläthylendiamin		0,23 ml
ad 100 ml H ₂ O pH 8,9		

<u>Lösung b</u>	Acrylamid	30,0 g
N'-N'-Methylenbisacrylamid		0,8 g
ad 100 ml H ₂ O		

Lösung c (frisch anzusetzen)

Ammoniumperoxodisulfat	0,14 g	ad 100 ml H ₂ O
------------------------	--------	----------------------------

Zur Herstellung eines 7,5 %igen Trenngels wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt: 1 Teil Lösung a, 2 Teile Lösung b, 4 Teile Lösung c, 1 Teil H₂O.

Elektrodenpuffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	6,0 g
Glycin	28,8 g
ad 1000 ml H ₂ O pH 8,3	

Zum Gebrauch wird eine 10 %ige wässrige Lösung von diesem Puffer hergestellt.

Leitbandenfarbstoff (zur Markierung der elektrophoretischen Wanderungsstrecke): Bromphenolblau 10 mg
ad 1000 ml H₂O.

Färbemethoden:

Saure Phosphatase (ANDERSON, SONG u. CHRISTOFF 1962)

Puffer zur Vorinkubation der Gele:

36 ml Veronal-Acetat (Michaelis)-Puffer 0,05 m pH 4,9

Lösung zur Vorinkubation der Gele mit Diazo-Kuppler:

Fast Garnet GBC-Salt	0,072 g
Veronal-Acetat-Puffer	0,05 m 36,0 ml pH 4,9

Hauptinkubationslösung:

Natrium-1-naphtylphosphat	0,036 g
Fast Garnet GBC-Salt	0,072 g
Veronal-Acetatpuffer	0,05 m 36,0 ml pH 4,9

Kontrolluntersuchungen:

Analog zu den histochemischen Untersuchungen wurden auch an den Elektrophoresegelen einiger Tumoren und unbehandelter Tiere Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Inkubation der Gele in Lösungen ohne Substrat, 30 min. Vorinkubation der Gele in 0,01 m L-Cysteinlösung bei pH 5,0; 0,001 m KCN- und 0,1 m NaCN-Lösung bei pH 5,0 und 37°C, Inkubationslösung mit 0,01 m NaF, 0,05 m L-Phenylalanin und 0,02 m L-Weinsäure.

Lactatdehydrogenase (NACHLAS u.Mitarb. 1958)

NAD ⁺	1 mg/1 ml H ₂ O	1,5 ml
Nitro Bluetrazolium	5 mg/1 ml H ₂ O	1,5 ml
Phosphatpuffer	1/15 m pH 7,4	5,0 ml
Natrium-DL-Lactat	0,5 m	3,0 ml
Aqua dest.		4,0 ml
Phenacin-Methosulfat	1mg/1 ml H ₂ O	0,25 ml/10 ml
Inkubationslösung		

Durchführung der Elektrophorese:

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden mit dem Gerät der Firma Canalco Inc. durchgeführt. Ebenso wurden alle für die Herstellung der Polyacrylamid-Gele notwendigen Chemikalien sowie sonstiges Zubehör für die Disc-Elektrophorese von der Herstellerfirma bezogen (Canalco Inc.). Durchführung der Disc-Elektrophorese nach RAYMOND u. WEINTRAUB (1959), RAYMOND, ORNSTEIN u. DAVIS (1964) und MAURER (1968).

- a. Die in 10 %iger Dichromat-Schwefelsäure gereinigten Gelröhrchen werden zunächst mit Aqua dest. und danach mit Ionenaustauscher-Wasser gespült, anschließend für etwa 5-10 Minuten in eine 1 %ige wässrige Lösung von Kodak-Photo-Flo (Lösung eines nicht ionogenen Tensids) getaucht und darauf in einem Trockenschrank aufrecht stehend getrocknet.
- b. Die Gelröhrchen werden in den Gelzubereitungsständer eingesetzt und dabei an der unteren Öffnung durch Parafilm verschlossen.
- c. Die nach der oben beschriebenen Anleitung frisch angesetzten Trenngellösung wird bis zu einer von der Unterseite gemessenen Markierung (entspricht etwa 1,5 ml) in die Röhrchen jeweils mit einer 10 ml-Spritze durch einen aufgesetzten Polyäthylenschlauch luftblasenfrei eingefüllt.

- d. Die Trenngellösung wird vorsichtig mit etwa 0,1 ml Aqua dest. überschichtet. Dabei ist besonders zu beachten, daß die Grenzen zwischen den Schichten scharf sind und auf keinen Fall Vermischung der Schichten auftreten darf. Dieser Arbeitsgang ist notwendig, um eine Meniskusbildung der Gele zu vermeiden. Man benutzt hierfür eine Tuberkulinspritze mit aufgesetzter stumpfer Spezialnadel.
- e. Es folgt eine 30 min. (LDH) bzw. 60 min. (saure Phosphatase) Polymerisation unter einer UV-Lampe.
- f. Nach der Polymerisation wird das überschichtete Wasser mit Filterpapierstreifen, ohne das Gel zu berühren, vorsichtig abgesaugt. Im Falle der Lactatdehydrogenase erfolgt nun die blasenfreie Auffüllung von 0,3 ml Substanzlösung (Zentrifugatüberstand-Saccharose-Gemisch).
- g. Für die Elektrophorese der sauren Phosphatase erfolgt nun die Zubereitung der Sammelgellösung. Mit einer Enzympipette wird 0,2 ml der Sammelgellösung in jedes Gelröhrchen luftblasenfrei eingefüllt und wieder in oben beschriebener Weise mit Aqua dest. überschichtet. Polymerisationsdauer: 60 Min.
- h. Anschließend wird kalter Elektrodenpuffer (Barbitursäure-Tris, pH 7,0; 4°C) luftblasenfrei über dem Sammelgel bis zum oberen Rand des Gelröhrchens eingefüllt. Nun wird mit einer Enzympipette der in das Elektrophoreseröhrchen eingefüllte Puffer mit jeweils 0,3 ml Substanzlösung unterschichtet. Alle beschriebenen Arbeitsgänge zum Einfüllen der Substanzlösungen müssen mit gekühlten Pipetten durchgeführt werden.

- i. Einsetzen der so präparierten Gelröhrchen in den oberen Elektrophoresetopf.
- j. Nach Einfüllen von 300 ml des jeweiligen Elektrodenpuffers in den oberen Puffertopf, werden nun bei Auftrennung der LDH 1 ml Bromphenolblaulösung zugesetzt, um die am schnellsten wandernden Enzymfraktionen zu markieren. Die restlichen 700 ml des Elektrodenpuffers werden in den unteren Puffertopf eingefüllt und eine Gleichspannung von 300 Volt bei 2,5 mA pro Röhrchen angelegt. Die elektrophoretische Auftrennung wird wegen der sich entwickelnden Wärme im Kühlschrank bei 4°C vollzogen.
- k. Dauer der Auftrennung bei der sauren Phosphatase 120 Minuten und bei der Lactatdehydrogenase 90 Minuten.
- l. Am Ende der Elektrophorese, nach Entnahme der Gelröhrchen aus dem Elektrophoresetopf, werden durch eine Spritze mit aufgesetzter, abgestumpfter Spezialnadel die Gele aus den Röhrchen entfernt.
- m. Die Gele werden in Inkubationsröhrchen eingesetzt und sofort inkubiert.

Saure Phosphatase: Zweimalige Vorinkubation.

(1) 15 Min. mit Veronalpuffer pH 4,9

(2) 15 Min. mit Veronalpuffer pH 4,9 und
Diazo-Kuppler

(3) Hauptinkubation: 120 Min. bei 37°C.

(Wegen der geringen Aktivität wurde bei Colontumoren und Colonschleimhaut die Inkubation bis auf 12h verlängert.)

Lactatdehydrogenase: 45 Min. Inkubation bei Zimmertemperatur.

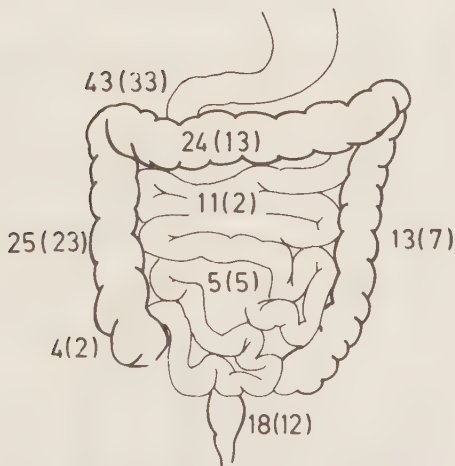
- n. Beendigung der Inkubation durch Spülen der Gele mit Aqua dest. Lagerung der Gele in 7,5 %iger Essigsäure in geschlossenen Gelaufbewahrungsröhrchen. Bei Lagerung der Gele im Kühlschrank blieben die Banden einwandfrei getrennt.
- o. Die Auswertung der Gele erfolgte auf einem Densitometer mit angeschlossenem Integralschreiber (Canalco Inc.; Modell K).

3. Ergebnisse

a) Verteilung und makroskopische Pathologie der Tumoren

Bei 149 Ratten (von insgesamt 150 Versuchstieren) konnten nach einer Induktionszeit von ca. 180-200 Tagen zumeist multiple Darmtumoren nachgewiesen werden. Es ist nicht möglich, exakte Angaben zur Zahl der Tumoren in den einzelnen Darmabschnitten zu geben, da in einzelnen Darmsegmenten (z.B. Rectum und Duodenum) häufig zahlreiche kleine, dicht bei dicht liegende Tumoren auftraten. Weiterhin konfluieren bei fortgeschrittener Cancerisierung die einzelnen Tumoren häufig zu einer geschlossenen Tumorplatte, die bei einzelnen Tieren den gesamten Dickdarm einnimmt. Aus diesem Grund kann nur die Häufigkeit des Tumorbefalls einzelner Darmabschnitte angegeben werden. Etwas mehr als die Hälfte der Tumoren ist im Dickdarm lokalisiert, wobei im Rectum 18 und im Colon ascendens 25 von 70 Dickdarmgeschwülsten, im Colon transversum 24 und Colon descendens 13 von 70 Dickdarmtumoren anzutreffen sind. Im Cäcum fanden sich nur 4 Geschwülste (Abb.2). 43 von 59 Dünndarmtumoren sind im Duodenum lokalisiert, die restlichen 15 verteilen sich gleichmäßig über das Jejunum und Ileum. Makroskopisch können polypöse und flach wachsende Tumoren beobachtet werden. Der Durchmesser der polypösen Geschwülste reicht von knapp 1 mm bis zu 1-2 cm. Der schwerste polypöse Tumor hatte ein Gewicht von 10 g. Histologisch handelt es sich bei den polypös wachsenden Tumoren zumeist um adenomatöse Polypen oder um Adenocarcinome. Bei den flach wachsenden Tumoren handelt es sich sehr häufig um solide Carcinome, die überwiegend im Colon lokalisiert sind. Diese Geschwülste können sich rasenartig über weite Schleimhautabschnitte ausbreiten. Sie durchsetzen oft die Darmwand in Art einer Linitis Plastica und neigen zur Metastasierung.

Tumorbefall der einzelnen Darmabschnitte
bei 143 Versuchstieren.
In Klammern Zahl der untersuchten Tumoren.



Zahl der untersuchten
Lymphknotenmetastasen: 36

Tab. I

a) Verteilung der Lymphknotenmetastasen

Omentum majus	Omentum minus (Große Kurvatur des Magens)	Leberpforte	Paraaortal, abdominal
25	4	5	2
Valvula ilieocæcalis	Lungenhilus		
4	4		

b) Verteilung von Organmetastasen

Lungen mit Pleuritis carcinomatosa	Leber
2	8

Metastasen:

74 von 143 Tumoren waren Lymphknoten- und Organmetastasen. Bei 137 Tieren konnten Metastasen nachgewiesen werden, am häufigsten in den Lymphknoten der Bauchhöhle und des retroperitonealen Raumes. Weiterhin fanden sich Lymphknotenmetastasen im Bereich der Lungenhili (4) sowie Organmetastasen in Leber (8) und Lunge mit Ausbildung einer Pleuritis carcinomatosa (2). Daneben entstanden durch Einwirkung des DMH auch extraintestinale Primärtumoren: Plattenepithelcarcinome, die vom Meatus akusticus externus ausgehen (20), und Gallengangsadenome (s.Tab.I).

b) Mikroskopische Pathologie der experimentell erzeugten Darmtumoren

Auf die mikroskopischen Befunde soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden. Eine ausführliche morphologische Beschreibung findet sich in einer vorausgegangenen Inauguraldisertation (DIETZEL 1975).

Histologisch können folgende Gruppen differenziert werden:

- Benigne Tumoren: 1. Hyperplastische Polypen und umschriebene hyperplastische Schleimhautveränderungen.
2. Adenomatöse Polypen und umschriebene, adenomatöse Schleimhautveränderungen.
- Maligne Tumoren: 1. Adenocarcinome mit und ohne Schleimbildung.
2. Solide Carcinome mit und ohne Schleimbildung.

Recht häufig können die einzelnen Carcinomformen nicht scharf voneinander abgetrennt werden, da es sowohl zwischen den einzelnen Formen der Adenocarcinome als auch den soliden Carcinomen Übergangs- und Mischformen gibt.

c) Verteilung und histologische Klassifizierung der
elektrophoretisch und histologisch untersuchten
Tumoren

Die wenigen hyperplastischen Polypen wurden in der folgenden Tabelle nicht gesondert aufgeführt, da sie wegen ihrer geringen Größe nicht elektrophoretisch untersucht werden können. Diese Tumoren können makroskopisch nicht wahrgenommen werden; sie wurden erst bei der lichtmikroskopischen Durchmusterung der histologischen Präparate zufällig entdeckt (s.Tab.II).

Tab. II

Histologische Klassifizierung und Lokalisation der untersuchten Tumoren:

Tumorform	Darmabschnitte	
	Dünndarm (Duodenum in Klammern)	Dickdarm
Adenomatöse Polypen	6 (4)	4
Adenocarcinome	21 (18)	31
schleimbildende Adenocarcinome	3 (3)	6
solide Carcinome	2 (1)	3
solide Carcinome mit Schleimbildung	3 (2)	8
Carcinome zu gleichen Teilen aus soliden und adenomatösen Anteilen bestehend	5 (5)	3

Bei 35 untersuchten Lymphknotenmetastasen fanden sich
30 Metastasen eines überwiegend soliden Carcinoms und
5 Metastasen eines überwiegend drüsenbildenden Carcinoms.

d) Disc-Elektrophorese und Enzymhistochemie

Saure Phosphatase (s.Ph.)

1. Disc-elektrophoretische Auftrennung der s.Ph.
in der normalen Schleimhaut:

Im Duodenum können 3 dicht beieinanderliegende Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. 3a).

Im Jejunum färben sich nur 2 Aktivitätsbanden, die im Duodenum vorhandene 3. und schnellste Fraktion ist nicht darstellbar.

Im Ileum läßt sich nur noch 1 aktivitätsschwache Zone nachweisen, die aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit wahrscheinlich mit der 1. Bande des Duodenums übereinstimmt (Abb. 3b).

Im gesamten Colon können mit den von uns verwendeten Substratlösungen elektrophoretisch keine Aktivitätsbanden nachgewiesen werden.

Kontrolluntersuchungen (Abb. 4):

Natriumcyanid und Natriumfluorid hemmen die Aktivität der sauren Phosphatase im Duodenum und Ileum vollständig.

Kaliumcyanid und L-Weinsäure schwächen die Aktivität von der 1. und 2. Fraktion im Duodenum und Jejunum ab, während sich die 3. Bande im Duodenum nicht mehr darstellt; ebenso färbt sich die schwache Aktivitätszone des Ileum nicht mehr an.

L-Phenylalanin bewirkt keinen wesentlichen Aktivitätsabfall der sauren Phosphatase in den Elektropherogrammen. Da sowohl bei Präinkubation der Gele in einer L-Cystein-Lösung, als auch bei einer Endkonzentration von 0,01 M L-Cystein in der Inkubationslösung der Azofarbstoff (Fast Garnet GBC Salt) ausflockt, kann über den Einfluß von L-Cystein auf die Aktivitätszonen der sauren Phosphatase keine Aussage gemacht werden.



Abb. 3a u. b: Disc-elektrophoretische Auftrennung
der sauren Phosphatasen des Duodenum(a)
und des Ileum(b) beim normalen Kontroll-
tier.

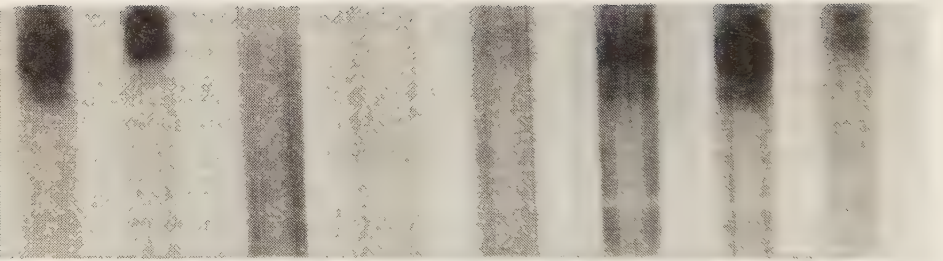


Abb. 4: Disc-elektrophoretische Auftrennung der sauren Phosphatasen im Duodenum eines normalen Kontrolltieres:
ohne Hemmung, nach Hemmung mit Kaliumcyanid, Natriumcyanid, L-Cystein, Natriumfluorid, 0,05 M und 0,005 M L-Phenylalanin sowie L-Weinsäure (Röhrchen von links nach rechts).

2. Disc-elektrophoretische Auftrennung der s.Ph. in Darmtumoren (Abb.5):

Bei Adenocarcinomen und adenomatösen Polypen kann im Duodenum 1 Aktivitätszone der sauren Phosphatase nachgewiesen werden, die sich nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit der 1. normalen Duodenalschleimhaut zuordnen läßt. Die Tumor-Bande zeigt eine teils niedrigere, teils höhere Aktivität als die korrespondierende Zone der Normalschleimhaut. Die soliden Carcinome zeigen im Duodenum ebenfalls nur eine Aktivitätszone, die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit der 1. Bande der sauren Phosphatase in der normalen Schleimhaut entspricht. Die Aktivität der sauren Phosphatase in dieser Zone variiert von Tumor zu Tumor, liegt jedoch im allgemeinen niedriger als die Aktivität der 1. Bande der Normalschleimhaut.

Im übrigen Dünndarm und im Dickdarm können bei adenomatösen Polypen und sämtlichen Carcinomen nur eine Fraktion der sauren Phosphatase nachgewiesen werden, die hinsichtlich ihrer Wanderungsgeschwindigkeit mit der 1. Fraktion der sauren Phosphatase des Jejunums bzw. der Einzelbande des Ileums vergleichbar ist. Die Aktivität dieser Fraktionen variiert von Tumor zu Tumor. Sie übertrifft zumeist die Aktivität in der Einzelzone der normalen Ileumschleimhaut und zeigt höhere Aktivitäten als die 1. Bande der normalen Duodenumschleimhaut.

Kontrolluntersuchungen (Abb.6):

Natriumcyanid hemmt die Aktivität der sauren Phosphatase vollständig, Kaliumcyanid, L-Weinsäure und L-Phenylalanin schwächen die Aktivitäten in unterschiedlichem Ausmaß ab. Auffallend ist die kaum wahrnehmbare Hemmwirkung des Natriumfluorid auf die Tumorfunktion der s.Ph.

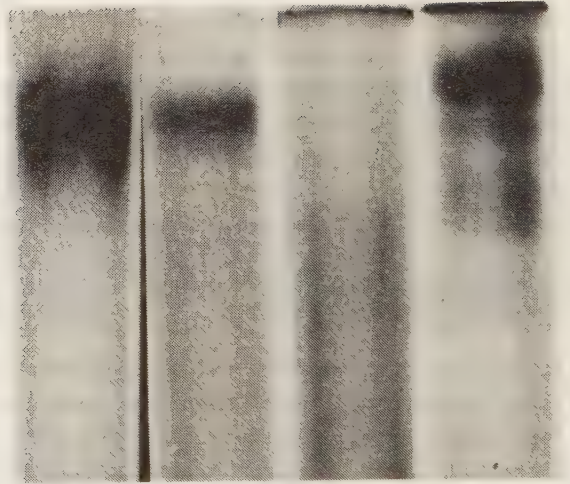


Abb.5: Disc-elektrophoretische Auftrennung der sauren Phosphatase in einem Adenocarcinom des Colon, einem Adenocarcinom des Duodenum, im normalen Colon und normalen Duodenum. (Röhrchen von links nach rechts)



Abt.6: Disc-elektrophoretische Auftrennung saurer Phosphatasen in einem Adenocarcinom des Duodenum: ohne Hemmung, nach Hemmung mit Kaliumcyanid, Natriumfluorid, 0,05 M und 0,005 M Phenylalanin sowie L-Weinsäure. (Röhrchen von links nach rechts.)

3. Histochemische Darstellung der sauren Phosphatase:

a) Normale Schleimhaut:

Mit den Methoden nach GOMORI, BARKA und ANDERSON sowie MEIER-RUGE können gleichartige histochemische Befunde erhoben werden. Bei Anwendung der Methode nach GOMORI färbt sich zusätzlich die Membran der Zellkerne an. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um ein Diffusionsartefakt. Im Zotten- und Kryptenepithel der Darmschleimhaut läßt sich die Aktivität der sauren Phosphatase in Form zahlreicher, supranukleär gelegener Granula nachweisen, wobei die Zylinderepithelien der Zotten eine höhere Aktivität als die Krypten aufweisen. Die höchste Aktivität kann histochemisch jedoch in den Panethschen Körnerzellen nachgewiesen werden. Auch in den Zellen des Zottenstromas findet sich eine granuläre Reaktion. Von proximal nach distal (vom Duodenum zum Colon) vermindert sich die Zahl der supranukleär gelegenen s.Ph. positiver Granula im Zottenepithel, während die histochemisch nachweisbare Aktivität der s.Ph. im Zottenstroma zuzunehmen scheint.

Kontrolluntersuchungen:

Natrium- und Kaliumcyanid hemmen bei Anwendung der Methode nach MEIER-RUGE die Aktivität im Zottenepithel vollständig; im Zottenstroma und den Panethschen Körnerzellen ist die Reaktion abgeschwächt. Bei der Methode nach GOMORI wird die saure Phosphatase sowohl in Epithelien und auch im Stroma deutlich abgeschwächt, aber nicht vollständig gehemmt. Natriumfluorid hemmt die Aktivität der s.Ph. in den Darmepithelien vollständig. L-Weinsäure hemmt die Aktivität der sauren Phosphatase sowohl im

Epithel als auch im Stroma vollständig. L-Cystein und L-Phenylalanin beeinflussen die Aktivität der sauren Phosphatase nicht.

In substratfreier Lösung färben sich die Präparate nicht an.

b) Histochemische Darstellung der sauren Phosphatase in den Darmtumoren:

Bei Anwendung der verschiedenen histochemischen Methoden ergibt sich eine identische Lokalisation der Aktivität der s.Ph.. Die s.Ph. zeigt einen feingranulären Reaktionsausfall, der in Adenocarcinomen überwiegend supranukleär und in soliden Carcinomen perinukleär lokalisiert ist. Während in der normalen Schleimhaut benachbarte Epithelzellen ein weitgehend gleichartiges histochemisches Bild zeigen, kann in den Tumorzellen die Tropik und die Stärke des Reaktionsausfalles in den einzelnen Tumorzellen erheblich variieren. Dies gilt sowohl für die adenomatösen Polypen, als auch für die verschiedenen Carcinomformen. Im allgemeinen ist die Aktivität in den Tumorzellen niedriger als in den Epithelien der normalen Schleimhaut. Eine hohe Aktivität an saurer Phosphatase läßt sich im Tumorstroma nachweisen. Ein Großteil dieser Aktivität kann in den im Interstitium zahlreich vorhandenen Makrophagen lokalisiert werden. Dabei zeigen die soliden Carcinome eine höhere Aktivität im Tumorstroma als die Adenocarcinome und adenomatösen Polypen. Die Adenocarcinome weisen hingegen hohe peritumoröse Aktivität an saurer Phosphatase auf. Auch hier findet sich die Hauptaktivität an saurer Phosphatase in Makrophagen. Dieser Unterschied zwischen soliden Carcinomen und Adenocarcinomen ist dadurch bedingt, daß in Umgebung der Adenocarcinome eine meist wesentlich intensivere chronisch-granulierende Entzündung mit ausgedehnter Makrophagenansammlung nachzuweisen ist, als in Umgebung solider Carcinome.

Kontrolluntersuchungen:

Natrium- und Kaliumcyanid hemmen die Aktivität der sauren Phosphatase bei Anwendung der Methoden nach ANDERSON und MEIER-RUGE u. BARKA vollständig, während im Tumorstroma noch eine geringe spezifische Aktivität nachweisbar bleibt. Bei der Methode nach GOMORI hingegen findet sich im Stroma noch eine deutliche und in den Tumorzellen eine geringe Aktivität an saurer Phosphatase.

L-Weinsäure hemmt bei Anwendung der GOMORI-Methode die Aktivität der sauren Phosphatase vollständig, während sich bei der Methode nach MEIER-RUGE, BARKA und ANDERSON noch eine geringe Aktivität im Stroma darstellt.

L-Cystein und L-Phenylalanin vermindern die Aktivität der sauren Phosphatase in den Tumorzellen nur leicht, während Natriumfluorid eine vollständige Aktivitätshemmung bewirkt.

In substratfreier Lösung finden sich in den Präparaten keine Farbstoffniederschläge auf.

Lactatdehydrogenase (LDH)

1. Disc-elektrophoretische Auftrennung der LDH in der normalen Schleimhaut:

In allen Darmabschnitten weist die LDH-1 die geringste Aktivität und LDH-3 u. LDH-4 die höchsten Aktivitäten auf. Wesentliche regionale Unterschiede im Isoenzymmuster der LDH finden sich im Darm nicht (Abb.7a u. b).

2. Disc-elektrophoretische Auftrennung der LDH in Darmtumoren (Abb.8a u. b; Abb.9):

Die Gesamtaktivität der LDH zeigt sowohl bei den adenomatösen Polypen als auch bei verschiedenen Carcinomen eine deutliche Schwankungsbreite. Bei einzelnen Tumoren

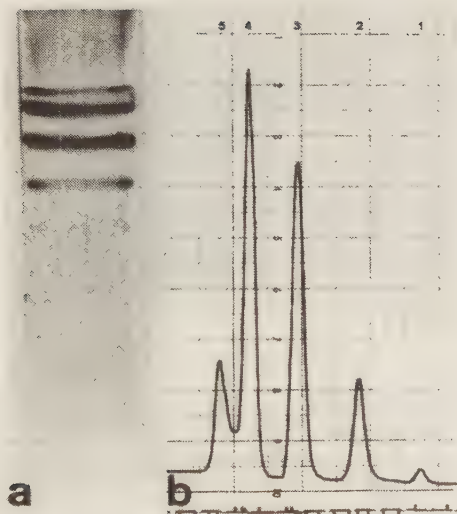


Abb. 7a u. b: Disc-elektrophoretische Auftrennung
der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase
im Duodenum.

Zymogramm (a), Densitogramm (b).

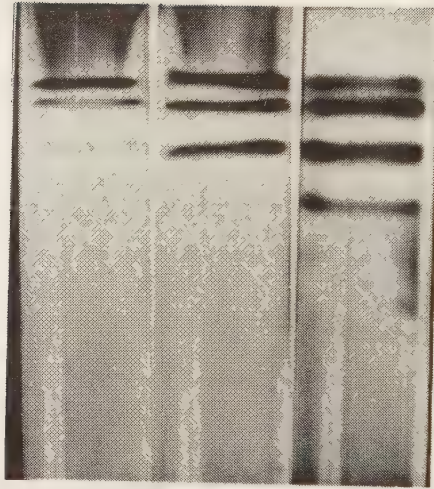


Abb.8a

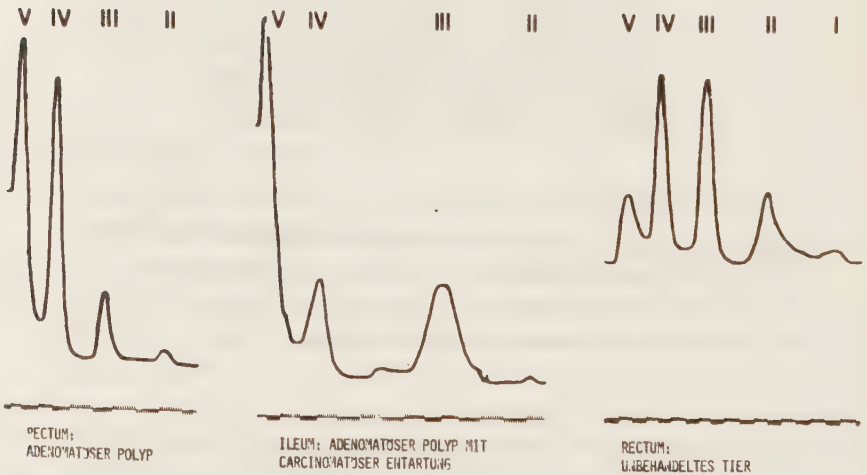


Abb.8b

Abb.8a u. b: Disc-elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase in einem adenomatösen Polyp im Rectum, einem adenomatösen Polyp mit carcinomatöser Entartung im Ileum und in einem normalen Rectum. Zymogramme(8a), Röhrrchen von links nach rechts, Densitogramme (8b).

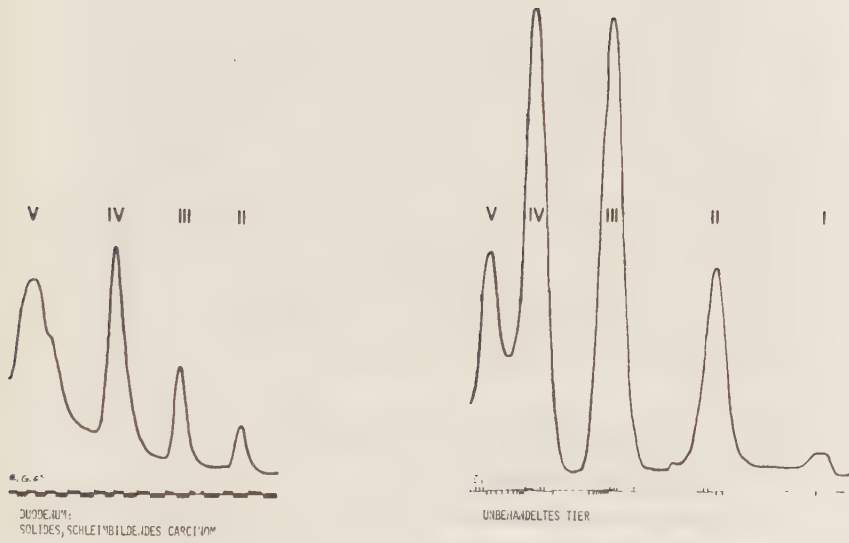


Abb.9: Disc-elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase in einem soliden, schleimbildenden Carcinom des Duodenum und in einem normalen Duodenum.

(adenomatöse Polypen und Carcinome) ist die Gesamtaktivität der LDH gegenüber der Enzymaktivität der normalen Mucosa vermindert, bei anderen übertrifft sie diese erheblich.

Bei sämtlichen adenomatösen Polypen, soliden und drüsenbildenden Carcinomen läßt sich Isoenzym LDH-1 nicht mehr nachweisen. Die Aktivität von LDH-4 und LDH-5 hingegen nimmt in allen Tumoren, also sowohl in adenomatösen Polypen, als auch in den Carcinomen zu, während sich die Aktivität von LDH-2 und LDH-3 in gleichem Verhältnis vermindert. Wesentliche regionale oder tumorartspezifische Unterschiede finden sich nicht, obwohl einzelne Tumoren erhebliche individuelle Aktivitätsschwankungen aufweisen, wie dies gerade für die Adenocarcinome charakteristisch ist.

3. Histochemische Darstellung der LDH:

a) Normale Schleimhaut:

Im Zotten- und Kryptenepithel sämtlicher Darmabschnitte findet sich eine deutliche Aktivität der LDH mit geringem proximo-distalen (vom Duodenum zum Colon) Abfall der Aktivität. Intraepithelial färben sich am stärksten die unmittelbar apikal gelegenen Cytoplasmabezirke an. Positiv reagieren auch die supra-, para- und infranukleären Epithelabschnitte. Eine spezifische Aktivität an LDH zeigen auch die Muskelzellen der Muscularis mucosae et propriae, die Ganglienzelle des Plexus myentericus et submucosus sowie die Wand der größeren Blutgefäße.

b) Histochemische Darstellung der LDH in Darmtumoren:

Hyperplastische Polypen: Histochemisch zeigt die LDH in der Epithelzelle eine gleichartige Lokalisation und Aktivitätshöhe wie in der Mucosa des korrespondierenden Darmabschnittes beim unbehandelten Tier.

Adenomatöse Polypen: Histochemisch zeigt die LDH in Dünn- und Dickdarm gleichartige Veränderungen. Im Vergleich mit der normalen Schleimhaut fällt die Aktivität der LDH im apikalen Bereich der Tumorepithelien ab. In einzelnen Drüenschläuchen allerdings kann die Aktivität herdförmig stärker sein als im Oberflächenepithel der normalen Mucosa.

Adenocarcinome: Histochemisch findet sich ein weitgehend ähnliches Bild wie bei den adenomatösen Polypen. Allerdings zeigen die Adenocarcinome im verstärkten Maße fleckförmige regionale Aktivitätsunterschiede im gleichen Tumor und häufig auch im gleichen Drüenschlauch. Von Tumor zu Tumor wechselt die histochemisch nachweisbare Aktivität der LDH deutlich ohne erkennbaren Zusammenhang zwischen Aktivitätshöhe und intrazellulärer Lokalisation einerseits, sowie Lokalisation des Tumors andererseits. Im allgemeinen jedoch weisen schleimbildende Epithelien eine niedrigere LDH-Aktivität auf als nicht schleimbildende Epithelien, auch wenn sie im gleichen Drüsenverband lokalisiert sind.

Solide Carcinome: Insgesamt ist die Aktivität der LDH in den Epithelien der soliden Carcinome niedriger als in denjenigen drüsenbildender Tumoren. In den soliden Carcinomen bietet sich ein sehr unregelmäßiges histochemisches Bild, da einzelne Tumorzellen oder auch Zellgruppen eine sehr hohe LDH-Aktivität aufweisen können, die sogar diejenige im Zottenepithel der normalen Mucosa übersteigt. Derartige sprunghafte Aktivitätsänderungen finden sich regellos innerhalb der Tumoren ohne erkennbaren Zusammenhang zur Lokalisation der Carcinome.

4. Diskussion

Die disc-elektrophoretischen Untersuchungen der s.Ph. erbrachten folgende Ergebnisse: Bei unbehandelten Ratten lassen sich in der Schleimhaut des Duodenum 3 Fraktionen der s.Ph. auftrennen, im Ileum hingegen findet sich nur noch eine Aktivitätszone und im Colon kann mit den von uns verwendeten Homogenatmengen keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Bei sämtlichen Tumoren zeigt sich unabhängig von der Lokalisation nur eine Fraktion der s.Ph.. Die Aktivität der s.Ph. in der normalen Darmschleimhaut wird durch Natriumcyanid und Natriumfluorid vollständig und durch Kaliumcyanid sowie durch L-Weinsäure teilweise gehemmt, während L-Phenylalanin die Aktivität der s.Ph. nicht wesentlich beeinflusst. In den Tumoren hingegen hemmt nur Natriumcyanid die Aktivität der s.Ph. vollständig, während Kaliumcyanid, L-Weinsäure sowie L-Phenylalanin die Aktivität der s.Ph. in unterschiedlichem Maße abschwächt und Natriumfluorid nahezu keine Hemmwirkung hat. In den histochemischen Präparaten der normalen Darmschleimhaut finden sich in den Epithelzellen überwiegend supranucleär gelegene Farbstoffgranula, dabei nimmt die histochemisch nachweisbare Aktivität von den proximalen zu den distalen Darmabschnitten hin ab. In den Epithelien der adenomatösen Polypen und den Adenocarcinomen lassen sich in den supranucleären und bei den soliden Carcinomen in den perinucleären Anteilen der Tumorzellen teils fein-, teils grobgranuläre, spezifische Farbstoffpräzipitate nachweisen. Dabei zeigt sich histochemisch ein unregelmäßiges Bild, da Intensität und auch Lokalisation der Reaktion von Epithelzelle zu Epithelzelle im gleichen Tumor variieren können. Zwischen den Drüsenschläuchen und soliden Epithelverbänden der Tumoren weisen zahlreiche Zellen des Makrophagensystems eine hohe Aktivität auf (DIETZEL 1975).

Das unterschiedliche elektrophoretische Verhalten der s.Ph. in der normalen Schleimhaut einerseits und den Tumoren andererseits kann nur schwer gedeutet werden, da entsprechende Untersuchungen bisher nur in sehr geringer Zahl vorliegen und da weiterhin über die Funktion der s.Ph. in der Epithelzelle des Darmes nur wenig bekannt ist. Ob der s.Ph. eine Funktion bei der Resorption von Nahrungsbestandteilen zukommt, konnte bisher nicht schlüssig bewiesen werden. BARKA (1963, 1964) fand nach Fettfütterung einen Aktivitätsabfall der s.Ph. in den Lysosomen der Darmepithelien und schloß daraus, daß die s.Ph. möglicherweise eine Rolle bei der Fettresorption spielt. Nach BAXTER-GRILLO (1970) besitzt die s.Ph. eine Funktion beim physiologischen Abbau der Zottenepithelien, wie überhaupt bei degenerativen Zellveränderungen die intrazelluläre Aktivität der s.Ph. ansteigen soll (TAPPEL 1962, ZALKIN 1962, MELLORS u. Mitarb. 1967, MELLORS u. TAPPEL 1967, EMANUELLI 1969, HUGON u. BORGERS 1967, THOMAS 1967).

Daneben liegen auch einige Untersuchungen vor, in denen qualitative Änderungen der s.Ph.-Aktivität in Tumoren beschrieben werden. Nach REIF u. Mitarb. (1973) findet sich bei disc-elektrophoretischer Auftrennung der s.Ph. in Prostatacarcinomen ein Verlust von Aktivitätsfraktionen sowie eine Abnahme der Gesamtaktivität gegenüber dem normalen Prostatagewebe. Es konnten jedoch keine tumorspezifischen Fraktionen nachgewiesen werden. Hingegen beschreiben LI u. Mitarb. (1970) ein spezifisches Isoenzym der s.Ph. in isolierten Zellen der myeloischen Bildungsreihe bei myeloischer Leukämie. Histochemisch konnten KATAYAMA u. Mitarb. (1972) ein tartrat-resistentes Isoenzym der s.Ph. nachweisen, welches hauptsächlich in den Tumorzellen bei "leukämischer Reticuloendotheliose" nachgewiesen wurde. Der in den Tumorzellen histochemisch

häufig nachweisbare Abfall der Aktivität der s.Ph. wird auf einen Ausreifungsdefekt der Tumorzellen zurückgeführt (PADYKULA 1961, HODEL u. MEIER-RUGE 1966, CZERNOBILSKY 1968).

Im Zusammenhang mit der zunehmenden Bedeutung der carcinofoetalen Antigene in der menschlichen Tumordiagnostik ist im Rahmen dieser Arbeit von besonderer Wichtigkeit, ob sich die Isoenzymmuster der s.Ph. im Darm fetaler sowie neugeborener Ratten einerseits und in Darmtumoren andererseits einander gleichen. Daß der Nachweis von Isoenzymvarianten auch in der Tumordiagnostik erfolgversprechend zu sein scheint, zeigen die Untersuchungen von FISHMAN u. Mitarb. (1968), die bei einem Patienten mit einem Bronchialcarcinom im Serum ein mit dem Plazentarisoenzym der alkalischen Phosphatase übereinstimmendes Enzym, das sog. Regan-Isoenzym, nachweisen konnten. In den folgenden Jahren wurde dieses Isoenzym noch in einer Reihe weiterer Tumoren, z.B. auch bei Dickdarmcarcinomen gefunden (JACOBY u. BAGSHAVE 1971). Dieses Isoenzym wird in den Tumorzellen selbst gebildet im Sinne einer ektopischen Isoenzym synthese bei Depression des entsprechenden Genoms in den Tumorzellen (FISHMAN 1969). Neben dem Regan-Isoenzym können bei den einzelnen Tumorpatienten noch eine Reihe weiterer Isoenzymvarianten der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden (zusammenfassende Lit.: LAMERZ u. FATEH-MOGHADAN 1975, LEHMANN 1975). Während der fetalen Entwicklung der Ratte und postnatal bis zum Beginn der 4. Lebenswoche können im gesamten Darm der Ratte, also auch im Duodenum, wie bei den Tumoren nur eine Fraktion der s.Ph. nachgewiesen werden. Erst im Laufe der 4. Lebenswoche bildet sich das adulte Isoenzymmuster aus mit den typischen 3 Fraktionen in den Homogenaten der Duodenalschleimhaut (PAASCH 1975). Dabei zeigt die Einzelfraktion der s.Ph. im Darm neugeborener und fetaler Ratten eine mit der Tumorfraction

übereinstimmende Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamid-Gel. Des weiteren zeigt sich ein weitgehend gleichartiges Verhalten gegenüber den einzelnen, von uns angewendeten Hemmsubstanzen. So wird die Aktivität der s.Ph. in den Polyacrylamid-Gelen der Tumorphomogenate und der Mucosahomogenate des Darmes fetaler und neugeborener Ratten durch Natriumcyanid stark abgeschwächt, während Kaliumcyanid, L-Weinsäure und insbesondere Natriumfluorid die Aktivität nur ganz geringfügig vermindern. In der normalen Dünndarmschleimhaut hingegen werden nach Durchführung der Disc-Elektrophorese die einzelnen Fraktionen der s.Ph. durch Natriumcyanid und Natriumfluorid vollständig gehemmt und durch L-Weinsäure und Kaliumcyanid deutlich abgeschwächt. In den histochemischen Darmpräparaten hingegen zeigt die s.Ph. bei Anwendung der Nachweismethoden nach GOMORI, MEIER-RUGE sowie BARKA u. ANDERSON, sowohl bei neugeborenen und fetalen, als auch bei erwachsenen Ratten und in den Tumoren ein weitgehend gleichartiges Verhalten gegenüber den Hemmsubstanzen bei grundlegenden Unterschieden hinsichtlich Reaktionsstärke und Lokalisation des Reaktionsproduktes in den Epithelzellen. Bei Ratten bis zur 4. Lebenswoche finden sich im Oberflächenepithel des Ileum und Colon ascendens eine sehr hohe Aktivität der s.Ph. in einem supranucleär gelegenen Granulum, das in seiner Lokalisation dem apikalen Endozytosekomplex entspricht, sowie eine geringere, feingranuläre Ablagerung des Reaktionsproduktes im Duodenum. Nach der 4. Lebenswoche hingegen findet sich eine feingranuläre Ablagerung des Reaktionsproduktes in den supranucleären Bezirken der Oberflächenepithelien mit einem proximodistalen Aktivitätsabfall (SCHÄFER u. HÖHN 1975). In den Tumoren hingegen finden sich erhebliche regionale Aktivitätsunterschiede mit einer unregelmäßigen intrazellulären Ablagerung der Farbstoffgranula. Die Lokalisation der s.Ph. in dem supranucleär

gelegenen Endozytosekomplex bei Ratten bis zur 4. Lebenswoche steht sehr wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Fähigkeit der Epithelzelle in diesen Entwicklungsstadien Makromoleküle, insbesondere Immunglobuline durch Pinocytose aufzunehmen (MORRIS 1965, PIERCE u. SMITH 1967). Ob nun die Einzelfraktion der s.Ph. in den Tumoren identisch ist mit derjenigen in der Darmmucosa von Ratten bis zur 4. Lebenswoche und ob es sich hierbei möglicherweise um ein carcino-fetales Isoenzym bzw. Antigen handelt, ist aufgrund unserer Untersuchungen allein nicht sicher zu entscheiden. Ein Beweis könnte möglicherweise durch immunologische und weiterführende biochemische Untersuchungen erbracht werden. Gerade im Hinblick auf die Bedeutung der carcino-fetalen Antigene in der Diagnostik menschlicher Tumoren sollte eine derartige weiterführende Untersuchung an menschlichen Darmtumoren durchgeführt werden.

Weiterhin wird in den Tumorhomogenaten nicht nur die Tumorzelle, sondern auch andere Zellen, z.B. Makrophagen als Träger der s.Ph. erfaßt. Diese Einschränkung der Aussagefähigkeit der kombinierten disc-elektrophoretischen und histochemischen Untersuchungen gilt jedoch auch für Untersuchungen an der normalen Darmmucosa, da in der Lamina propria, insbesondere im Zottenstroma ebenfalls reichlich Makrophagen und andere s.Ph.-positive Zellen nachweisbar sind.

Die Lactatdehydrogenase (LDH) kann disc-elektrophoretisch in der normalen Dünn- und Dickdarmschleimhaut in 5 Isoenzyme aufgetrennt werden, wobei die Aktivitäten der einzelnen Zonen von Darmabschnitt zu Darmabschnitt nur gering variieren. Auch histochemisch bietet sich in den verschiedenen Darmabschnitten ein weitgehend gleichartiges Bild mit hoher Aktivität in den apikalen Bezirken der Epithelzellen, insbesondere der Zottenepithelien und geringeren supra-, peri- und infranucleären Enzymaktivitäten.

Konstantes Ergebnis bei elektrophoretischer Auftrennung der LDH in sämtlichen Tumoren, sowohl bei adenomatösen Polypen als auch bei den einzelnen Carcinomen, ist der Verlust der LDH-1 und eine Aktivitätszunahme der LDH-4 und LDH-5. Dabei zeigen die LDH-Isoenzymmuster adenomatöser Polypen und der einzelnen Carcinomformen keine wesentlichen Unterschiede. Während die Zahl der Formazangranula bei histochemischer Darstellung der LDH-Aktivität in den Epithelzellen adenomatöser Polypen gegenüber den Epithelzellen der normalen Schleimhaut zwar vermindert, jedoch noch recht gleichmäßig verteilt ist, finden sich in den Adenocarcinomen und soliden Carcinomen erhebliche regionale Aktivitätsunterschiede in ein und demselben Tumor. Dabei zeigen einzelne Tumorzellen oder Tumorzellgruppen eine höhere Aktivität als die Epithelien der normalen Mucosa, während die Mehrzahl der Tumorzellen in den Carcinomen eine schwächere Aktivität als die Epithelien der normalen Mucosa aufweisen.

Bedingt durch die Ergebnisse von WARBURG u. MINAMI (1923) sowie WARBURG u. Mitarb. (1926), daß in Tumorzellen gegenüber normalen Zellen eine erhöhte Glykolyserate vorliegt mit hoher Aktivität der glykolytischen Enzyme (GREENSTEIN 1959) und seit der Kenntnis von der molekularen Heterogenität der LDH (VESELL u. BEARN 1957, PFLEIDERER u. JECKEL 1957), finden sich zahlreiche Untersuchungen zur Biochemie und Genetik der LDH unter besonderer Berücksichtigung der Ontogenese der LDH-Isoenzyme und dem Verhalten der LDH-Isoenzyme in Tumoren. Insbesondere durch die Weiterentwicklung elektrophoretischer Methoden war es möglich, mit verschiedenen Trennverfahren die LDH-Isoenzyme darzustellen (WIEME 1959, WIELAND u. PFLEIDERER 1961, MARKERT u. URSPRUNG 1962). Aufgrund ihrer hohen Trennschärfe eignet sich jedoch in besonderem Maße die diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese (Disc-Elektrophorese) zur

Auftrennung der LDH-Isoenzyme (GOLDBERG 1963, DIETZ und LUBRANO 1967, DIETZ u.Mitarb. 1970).

Entsprechend unseren Ergebnissen konnte in einer Vielzahl von LDH-Isoenzymuntersuchungen, auch in menschlichen Tumoren ein "shift" zu den kathodischen LDH-Fraktionen nachgewiesen werden (PFLEIDERER u. WACHSMUTH 1961, LATNER u.Mitarb. 1965 u. 1966, BOHN 1966, LANGVAD 1969, LANGVAD u. ROED-PETERSEN 1969, LANGVAD u. NØDSKOV-PEDERSEN 1969, LANGVAD u.Mitarb.1970). Die in diesen Untersuchungen nachgewiesene Aktivitätszunahme von LDH-5 und Abnahme der LDH-1 steht sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem veränderten Stoffwechsellmilieu in den Tumorzellen. In den Tumorzellen findet sich gegenüber normalen Zellen eine verstärkte, nichtmitochondriale Oxidation des reduzierten NAD durch Pyruvatreduktion. Die optimale Pyruvatkonzentration liegt jedoch für LDH-5 etwa 8mal höher als für LDH-1 (PLAGEMANN u.Mitarb., 1960). Weiterhin kann durch eine erhöhte O_2 -Zufuhr die Prädominanz von LDH-5 und LDH-4 gehemmt werden. Daneben finden sich eine Reihe von Untersuchungen, in denen nachgewiesen wurde, daß bei Tumoren des gleichen Organs mit zunehmendem Malignitätsgrad ein schrittweiser "shift" von der anodischen zu den kathodischen LDH-Isoenzymen erfolgt. So dominiert nach OMI und ANAN (1970) in Schilddrüsenadenomen der H-Typ der LDH und bei Schilddrüsenkarzinomen hingegen der M-Typ der LDH. Über gleichartige Ergebnisse bei benignen und malignen Hirntumoren berichten GERHARDT u.Mitarb. (1963) sowie STAVROU u.Mitarb. (1973). Bei den von uns untersuchten Darmtumoren hingegen zeigen sowohl die adenomatösen Polypen als auch die Carcinome ein gleichartiges Isoenzymmuster mit einer Dominanz der H-Untereinheiten der LDH. Ein gleichartiges Isoenzymmuster wie bei den Tumoren findet sich auch in der Darmschleimhaut fetaler Ratten und während der postnatalen Entwicklung mit einer Adaptation an das

Isoenzymmuster erwachsener Tiere während der 4. Lebenswoche (PAASCH 1975). Dieser "shift" zu den anodischen Fraktionen der LDH während der Organentwicklung kann bei zahlreichen Spezies und auch beim Menschen nachgewiesen werden (PFLEIDERER u. WACHSMUTH 1961, MARKERT u. URSPRUNG 1962, CAHN u. Mitarb. 1966, FIELDHOUSE u. MASTERS 1966, PAPAKONSTANTINOU 1967, zusammenfassende Lit.: KOWALEWSKI 1972). Die Enzymdifferenzierung mit Ausbildung des adulten Isoenzymmusters erfolgt jedoch bei den verschiedenen Spezies in unterschiedlich langen Entwicklungsperioden (FINE u. Mitarb. 1963). Dieser Zeitraum scheint für die Enzymdifferenzierung, zumindest in den Organen der Ratte, fixiert zu sein (HÖHN u. SCHÄFER 1972). Die Steuerung dieser enzymatischen Anpassungsvorgänge, zumindest während der Organentwicklung und möglicherweise auch in den Tumoren, erfolgt durch das Stoffwechsellmilieu und wahrscheinlich nicht durch hormonelle oder zentrale Mechanismen.

Trotz der großen Anzahl von Untersuchungen über das Isoenzymmuster der LDH in Organen und im Serum bei verschiedenen Erkrankungen konnten nur in wenigen Ausnahmen bei bestimmten Erkrankungen typische Isoenzymmuster nachgewiesen werden (KOWALEWSKI 1972). Neben biochemischen und ontogenetischen Fragestellungen erlangen LDH-Isoenzymbestimmungen möglicherweise in der Onkologie eine zunehmende Bedeutung im Rahmen der Früherkennung bösartiger Tumoren. So fanden einige Untersucher den "shift" zu den kathodischen Isoenzymfraktionen der LDH schon bevor lichtmikroskopisch eindeutig maligne Epithelveränderungen nachgewiesen werden konnten, z.B. an der Cervix uteri (LATNER u. Mitarb. 1966) und in der Umgebung von Dickdarmcarcinomen bei lichtmikroskopisch noch unauffälligen Epithelzellen (LANGVAD 1968). Möglicherweise können diese biochemisch faßbaren Frühveränderungen, im Ablauf der malignen Transformation der Epithelzellen, in Form eines diagnostischen Tests in der klinisch-onkologischen Diagnostik mit herangezogen werden.

5. Zusammenfassung

1. 150 Ratten eines Wistar-Stammes des Pathologischen Institutes der Universität Mainz wurde das Carcinogen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) subcutan injiziert (Dosis: 21 mg DMH-Base/kg Tiergewicht). Alle Tiere entwickelten nach einer Induktion von 180 Tagen Darmtumoren.
2. In der normalen Schleimhaut des Duodenum können 3 Fraktionen, im Ileum 1 und im Colon bei den von uns verwendeten Homogenatmengen keine Fraktionen der sauren Phosphatase (s.Ph.) nachgewiesen werden. In sämtlichen Tumoren hingegen findet sich 1 Fraktion der s.Ph., deren Wanderungsgeschwindigkeit und Verhalten gegenüber einigen Hemmsubstanzen der Fraktion der s.Ph. im Darm fetaler und neugeborener Ratten entspricht.
3. Mit drei verschiedenen histochemischen Methoden wurde die s.Ph. in den Tumoren und der normalen Darmschleimhaut nachgewiesen. Dabei fällt eine unregelmäßige Lokalisation der Aktivität der s.Ph. in den einzelnen Tumorregionen auf, die mit zunehmender Entdifferenzierung der Carcinome zunimmt.
4. Die Lactatdehydrogenase (LDH) kann in der Darmschleimhaut in 5 Isoenzyme aufgetrennt werden. In den Tumoren beobachtet man gegenüber den Verhältnissen in der normalen Schleimhaut einen Verlust von LDH-1 und einen starken Aktivitätsanstieg von LDH-4 und LDH-5. Gleichartige Isoenzymmuster wie in den Tumoren, finden sich auch in der Mucosa fetaler und neugeborener Ratten.

5. Beim histochemischen Nachweis der LDH sieht man innerhalb der Tumoren eine unregelmäßige Verteilung der LDH-Aktivität mit zumeist niedrigerer Aktivität, herdförmig jedoch auch teilweise deutlich höherer Aktivität, als in der normalen Darmschleimhaut.
6. Die Ergebnisse der Isoenzymuntersuchungen in den Tumoren werden im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung in der klinisch-onkologischen Diagnostik diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1. P.J.ANDERSON, S.K.SONG, N.CHRISTOFF:
The Cytochemistry of Acid Phosphatase in
Neural Tissue.
Proceedings of the IVth International Congress
on Neuropathology, 1, S. 75-79,
Georg Thieme, Stuttgart (1962)
2. E.APPELLA, C.L.MARKERT:
Dissociation of Lactate Dehydrogenase Subunits
with Guanidine Hydrochloride.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 6, S.171 (1961)
3. T.BARKA:
Studies of Acid Phosphatase. I. Elektrophoretic
Separation of Acid Phosphatase of Rat Liver on
Polyacrylamide Gels.
J.Histochem.Cytochem. 9,5, S.542-547 (1961)
4. T.BARKA, P.J.ANDERSON:
Histochemical Methods for Acid Phosphatase
using Hexazonium Pararosanilin as Coupler.
J.Histochem.Cytochem. 10, S.741-753 (1962)
5. T.BARKA:
Fat Absorption and Acid Phosphatase Activity
in Intestinal Epithelium of Mice.
J.Am.Med.Ass. 183, S.761-764 (1963)
6. T.BARKA:
II. Electron Histochemical Localisation of
Epithelium.
J.Histochem.Cytochem. 13, S.9 (1964)
7. D.L.BAXTER-GRILLO:
Enzyme Histochemistry and Hormone of the
Developing Gastrointestinal Tract of the Chick
Embryo. IV. The Enzyme Activity during Functional
Differentiation.
Histochemie 21, S.268-276 (1970)
8. D.J.BEADLE u.Mitarb.:
Ultrastructural localisation of acid phosphatase,
non specific esterase and β -Glucuronidase in the
midgut epithelium of tenebric molitor Schisto-
cerea gregoria and Carausius merosus.
Histochemie 28, S.243-249 (1972)

9. M.BEHNKE:
Demonstration of acid phosphatase containing granules and cytoplasmic bodies in the epithelium of foetal rat duodenum during certain stages differentiation.
J.Cell.Biol. 18, S.251-265 (1963)
10. I.A.BRODY:
The significance of lactate dehydrogenase isoenzymes in abnormal human skeletal muscle.
Neurology 14, S.1091 (1964)
11. L.BOHN:
Laktatdehydrogenases Isoenzymer.
Nordisk Medicin 76, 43, S.1248-1249 (1966)
12. W.J.BURDETTE:
Identification of antecedents of colorectal cancer.
Cancer 28,1, S.51-58 (1971)
13. W.J.BURDETTE:
Colorectal carcinogenesis.
Cancer 34,3, Suppl.S.873-877 (1974)
14. M.S.BURSTONE:
Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol-AS-phosphates.
J.Nat.Cancer Inst. 21, S.523-539 (1958)
15. R.D.CAHN, N.O.KAPLAN, L.LEVINE, E.ZWILLING:
Nature and development of lactic dehydrogenase.
Science 136, S.962 (1962)
16. R.D.CAHN:
Cellular damage and the controll of lactic dehydrogenase synthesis in cell cultures by oxidative metabolites.
J.Cell.Biol. 19, S.124 (1963)
17. R.D.CAHN:
Development changes in embryonic enzyme patterns: The effect of oxidative substrates on lactic dehydrogenase in beating chick embryonic heart cell lactures.
Dev.Biol. 9, S.327 (1964)
18. R.CORNELL, A.PADYKULA:
A cytochemical study of intestinal absorption in the postnatal rat.
Anat.Rec. 151, S.339 (1965)

19. B.CZERNOBILSKY, K.-C.TSOU:
Adenocarcinoma, adenomas and polyps of the colon.
Cancer 21, S.165-177 (1968)
20. D.M.DAWSON, T.L.GOODFRIEND, N.O.KAPLAN:
Lactic dehydrogenases: Funktion of two types.
Science 143, S.929 (1964)
21. A.A.DIETZ, T.LUMBRANO:
Separation and quantitation of lactic dehydrogenase
isoenzymes by disc-electrophoresis.
Analyt.Biochem. 20, S.246-257 (1967)
22. A.A.DIETZ, T.LUMBRANO u.Mitarb.:
Disc-elektrophoresis of lactate dehydrogenase
isoenzymes.
Clin.Chim.Acta 27, S.225-232 (1970)
23. R.DIETZEL:
Vergleichende enzymhistochemische und histo-
logische Untersuchungen an experimentell er-
zeugten Darmtumoren.
Inauguraldissertation, Mainz (1975)
24. H.DRUCKREY, R.PREUSSMANN, S.IVANKOVIV, H.C.SCHMIDT,
B.T.SO, C.THOMAS:
Carcinogene Wirkung von Azoäthan und Azoxyäthan
an Ratten.
Z.Krebsforsch. 67, S.31-45 (1965)
25. C.DE DUVE:
The lysosome.
Sci.Amer. 156, S.2-10 (1963)
26. C.DE DUVE:
From cytochromes to lysosomes.
Fed.Proc. 23, S.1045-1049 (1964)
27. G.EMANUELLI u.Mitarb.:
Lysosomal damage and its possible relationship
with mitochondrial lesion in rat kidney under
obstructive jaundice.
Clin.Chim.Acta 25, S.167-172 (1969)
28. J.T.EVANS, G.LUTMAN, A.MITTELMAN:
The induction of multiple large bowel neoplasms
in mice.
J.Med.3, S.212-215 (1972)
29. B.FIELDHOUSE, C.J.MASTERS:
Developmental redistribution of porcine lactate
dehydrogenase.
Biochem.Biophys.Acta 118, S.538-548 (1966)

30. J.H.FINE u.Mitarb.:
Developmental changes of mammalian lactic
dehydrogenases.
Biochemistry 2, S.116-121 (1963)
31. W.H.FISHMAN, N.R.INGLIS, S.GREEN, C.ANSTISS,
N.K.GOSH, A.E.REIF, R.RUSTIGIAN, M.J.KRANT,
L.L.STOLBACH:
Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme
of alkaline phosphatase in human cancer.
Nature 219, S.697 (1968)
32. W.H.FISHMAN:
Immunologic and biochemical approaches to
alkaline phosphatase isoenzyme analysis: the
Regan isoenzyme.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 166, S.745 (1969)
33. D.FRIČ, Z.LOJDA, J.JODL:
Heterogeneity of enzymes of small-intestinal
mucosa in malabsorption syndrome.
Česky Gastroenterologie 22, S.235-249 (1968)
34. W.GERHARD, J.CLAUSEN, E.CHRISTENSEN, J.RIISHEDE:
Changes of LDH-isoenzymes, esterases, acid
phosphatases and proteins in malignant and
benign brain tumors.
Acta neurol.scand. 39, S.85 (1963)
35. W.GERHARDT, J.CLAUSEN, E.CHRISTENSEN, J.RIISHEDE:
Lactate dehydrogenase isoenzyme in the diagnosis
of human benign and malignant tumors, (1967)
36. E.GOLDBERG:
Lactic and malic dehydrogenases in human
apermatozoa.
Science 139, S.602-603 (1963)
37. G.GOMORI:
An improved histochemical technique for acid
phosphatase.
Stain Technol. 25, S.81-85 (1950)
38. T.L.GOODFRIEND, N.O.KAPLAN:
Induction of changes in the subunit composition
of lactic dehydrogenase.
J.Cell.Biol. 19, S.287 (1963)
39. T.L.GOODFRIEND, D.M.SOKOL, N.O.KAPLAN:
Control of Synthesis of lactic acid dehydrogenases.
J.Molec.Biol. 15, S.18 (1966)

40. J.P.GREENSTEIN:
Biochemistry of cancer.
2. Aufl., Academic Press, New York (1959)
41. C.HODEL, K.W.MEIER-RUGE:
Enzyme histochemical investigations on giant
cells of specific and nonspecific granulation
tissue and of malignant tumors.
Path.Europ. 1, 4, S.425-432 (1966)
42. P.HÖHN, G.WALTHER, H.LEITHOFF:
Disc-elektrophoretische Differenzierung saurer
Phosphatasen.
Z.f.Rechtsmedizin 68, S.129-137 (1971)
P.HÖHN, A.SCHÄFER (1974)
43. C.HOLT:
Exper.Cell.Res.1, Suppl.7, S.1 (1959)
44. J.S.HUGON, M.BORGERS:
Submicroscopic localisation of the alkaline
phosphatase activity in the duodenum of the rat.
Exper.Cell.Res., 45, S.698-702 (1966)
45. J.S.HUGON, M.BORGERS:
Fine structural localisation of three lysosomal
enzymes and nonspecific alkaline phosphatase in
the villus of the human duodenum.
Gastroenterology 55,5,S.608-616 (1967)
46. J.S.HUGON, C.CHARNEL:
Mouse intestinal sensitivity to cyclohexamide:
A morphological cytochemical and biochemical study.
Histochemie 27, S.50-62 (1971)
47. N.IWAI:
Histochemical studies of small and large bowels,
I. Some enzymatic activities of normal human and
laboratory animals.
Jap.Arch.Intern.Med., 16, S.227-241 (1969)
48. J.JACOBY, K.D.BAGSHAVE:
Placental-type alkaline phosphatase from human
tumor tissue.
Clin.Chim.Acta 35, S.473 (1971)
49. H.R.JERVIS:
Enzymes in the mucosa of the small intestine of
the rat, the guinea pig and the rabbit.
J.Histochem.Cytochem., 11, S.692-699 (1963)

50. N.O.KAPLAN:
Nature of multiple molecular forms of enzymes.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 151, S.382 (1968)
51. N.O.KAPLAN, J.EVERSE, J.ADMIRAAL:
Significance of substrate inhibition of
dehydrogenases.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 151, S.400 (1968)
52. R.KASCHNITZ:
Disc-elektrophoretische Trennung von Isoenzymen
der sauren Prostata-Phosphatase.
Z.f.klin.Chem. 5,6, S.3 (1967)
53. I.KATAYAMA, C.Y.LI, L.T.YAM:
Histochemical study of acid phosphatase isoenzyme
in leukemic reticuloendotheliosis.
Cancer 29,1, S.157-164 (1972)
54. S.L.KOWALEWSKI:
Biochemie und Klinik; Die Isoenzyme der
Lactatdehydrogenase.
Georg Thieme, Stuttgart, (1972)
55. R.LAMERZ, A.FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene; III.Andere carcinofetale
Antigene.
Klin.Wschr. 53, S.403-417 (1975)
56. E.LANGVAD:
Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in
the tumor-bearing colon.
Int.J.Cancer 3, S.17 (1968)
57. E.LANGVAD:
Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in
bronchogenic carcinoma.
Europ.J.Cancer 4, S.107 (1968)
58. E.LANGVAD:
Reversible and irreversible LDH isoenzymatic
alterations in malignant and non-malignant murine
tissues during cultivation: A correlation between
tumor morphology and isoenzyme structure.
Acta Path.Microbiol.Scand. 76,S.432 (1969)
59. E.LANGVAD, S.NØDSKOV-FEDERSEN:
LDH-isoenzyme patterns in the non-malignant and
malignant uterine cervix.
Cancer, 23, S.1171 (1969)

60. E.LANGVAD, B.ROED-PETERSEN:
Studies in oral leukoplakias XVII: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in oral leukoplakia.
Acta Path.Microbiol.Scand., 75, S.193 (1969)
61. E.LANGVAD, B.ROED-PETERSEN:
Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in oral leukoplakias and in clinically uninvolved oral mucosa of the same persons.
Acta Path.Microbiol.Scand. 78, S.505-509 (1970)
62. G.L.LAQUEUR, O.MICKELSEN, M.G.WHITING, L.T.KURLAND:
Carcinogenic properties of nuts from *Cycas circinalis* L.indigenous to Guam.
J.nat.Cancer Inst. 31, S.919-951 (1963)
63. G.L.LAQUEUR:
The induction of intestinal neoplasms in rats with the glycoside Cycasin and its aglycon.
Arch.f.Path.Anat. 340, S.151-163 (1965)
64. A.L.LATNER, P.S.GARDENER, D.M.TURNER, J.O.BROWN:
Lancet I, S.197 (1965)
65. A.L.LATNER, D.M.TURNER, S.A.WAY:
Enzyme and isoenzyme studies in preinvasive carcinoma of the cervix.
Lancet, II, S.814 (1966)
66. F.G.LEHMANN:
Serologische Tumordiagnostik.
Internist 16, S.214-222 (1975)
67. C.Y.LI, L.T.YAM, K.W.LAM:
Studies of acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes. Demonstration of isoenzyme-cell specificity.
J.Histochem.Cytochem. 18, S.901-910 (1970)
68. D.T.LINDSAY:
Isozymic patterns and properties of lactate dehydrogenase from developing tissues of the chicken.
J.Exp. Zool., 152, S.75 (1963)
69. Z.LOJDA, P.FRÍČ, J.JODL, V.CHMELÍK:
Cytochemistry of the human jejunal mucosa in the norm and malabsorption syndrome.
Curr.Top.Path., 52, S.1-63 (1970)

70. S.MARKERT, F.MÖLLER:
Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns.
Proc.natl. Acad.Sci. (Wash.), 45, S.753 (1959)
71. C.L.MARKERT, H.URSPRUNG:
The ontogeny of isoenzyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse.
Develop.Biol. 5, S.363-381 (1962)
72. H.R.MAURER:
Disc-Elektrophorese; Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.
De Gruyter, Berlin (1968)
73. A.E.F.H. MEIJER:
Semipermeable membranes for improving histochemical demonstration of enzymes activities in tissue sections.I. Acid phosphatase.
Histochemie 30, S. 31-39 (1972)
74. MEIER-RUGE:
Der diagnostische Wert der Enzymhistochemie in der Tumorforschung.
Acta Facul.Med.Zagreb., 18, Suppl.S.1 (1970)
75. W.MEIER-RUGE:
Incubation media for routine laboratory work on enzyme histochemistry.
Beitr.Path., 144, S.409-431 (1971)
76. A.MELLORS u.Mitarb.:
Mitochondrial swelling and uncoupling of oxidative phosphorylation by lysosomes.
Biochem.Biophys.Acta 143, S.299-309 (1967)
77. P.MILLINGTON, A.BROWN:
Elektron microscope studies of the distribution of phosphatases in the rat intestinal epithelium from birth to ten days after weaning.
Histochemie 6, S.109-121 (1967)
78. I.G.MORRIS:
The transmission of anti-Brucella abortus agglutinines across the gut in young rats.
Proc.Roy.Soc. (London) Serb.D.,163, S.402-416 (1965)
79. M.NACHLAS, D.WALKER, A.SELIGMAN:
A histochemical method for demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase.
J.Biophys.Biochem.Cytol., 4,S.29-38 (1958)

80. OGAWA u.Mitarb.:
Elektron histochemical demonstration of acid
phosphatase in normal rat jejunum.
J.Histochem.Cytochem. 10, S.228 (1963)
81. Y.OMI, F.K.ANAN:
Lactate dehydrogenase isoenzymes of thyroid
tissue in various thyroid gland diseases.
Enzymol.Biol.Clin. 11, S.224 (1970)
82. L.ORNSTEIN:
Disc-elektrophoresis I.Background and theory.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, S.321 (1964)
83. H.OSSWALD, KRÜGER:
Die cancerogene Wirkung von 1,2-Dimethylhydrazin
beim Goldhamster.
Arzneimittelforschung, 19, S.1891-1892 (1969)
84. K.PAASCH:
Disc-elektrophoretische Untersuchungen zur post-
natalen Differenzierung des Enzymmusters der
sauren Phosphatase und Lactatdehydrogenase im
Darm der Ratte.
Inauguraldissertation, Mainz (1975)
85. H.A.PADYKULA, F.W.STRAUSS, A.J.LADMAN, F.H.GARDENER:
Amorphologie and histochemical analysis of the
human jejunal epithelium in non tropikal sprue.
Gastroenterology 40, S.735-765 (1961)
86. J.PAPACONSTANTINOU:
Molekular aspects of cell differentiation.
Science, 156, S.338-346 (1967)
87. A.G.PEARSE:
Histochemistry, Vol I, S.545, J.and A.CHURCHILL,
London (1968) Vol II, S.921, CHURCHILL and
LIVINGSTONE, London (1972)
88. M.PEGG, A.HAWKS:
Increased transfer-RNA-methylase activity in
tumors induced in the mouse colon by administration
of 1,2-DMH.
Biochem.J., 122, S.121-123 (1971)
89. G.PFLEIDERER, D.JECKEL:
Individuelle Milchsäuredehydrogenasen bei ver-
schiedenen Säugetieren.
Biochem.Z., 329, S.370 (1957)

90. G.PFLEIDERER, E.D.WACHSMUTH:
Alters- und funktionsabhängige Differenzierung
der Lactatdehydrogenase menschlicher Organe.
Biochem.Z.334, S.185 (1961)
91. A.E.PIERCE, N.W.SMITH:
The intestinal absorption pig and bowine immune
lactoglobulin and human serum albumin by the newborn
pig.
J.Physiol., 190, S.1-18 (1967)
92. A.E.PIERCE, N.W.SMITH:
The in vitro transfer of bovine immune lactoglobulin
across the intestine of newborn pigs.
J.Physiol., 190, S.19-34 (1967)
93. P.G.W.PLAGEMANN, K.F.GREGORY, F.WROBLEWSKI:
The electrophoretic distinct forms of mammalian
lactic dehydrogenas.
II.Properties and interrelationship of rabbit
and human lactic dehydrogenase.
J.Biol.Chem., 235, S.2288 (1960)
94. K.M.POZHARISKIJ:
Intestinal tumors induced in rats with 1,2-
Dimethylhydrazine.
Vop.Onkol.N.S., 18,1, S.64-71 (1972)
95. S.RAYMOND, L.WEINTRAUB:
Acrylamid gel as an supporting medium for zone
electrophoresis.
Science, 130, S.711 (1959)
96. A.E.REIF, R.M.SCHLESINGER, C.A.FISH, C.M.ROBINSON:
Acid phosphatase isozymes in cancer of the
prostate.
Cancer, 31, 3, S.689-699 (1973)
97. E.O.RIEKEN, R.H.DOWLING, C.C.BOOTH, A.G.PEARSE:
Histochemical changes in the rat small intestine
associated with enhanced absorption high bulk
feeding.
Enzymol.Biol.Clin., 5,S.231-244 (1965)
98. E.O.RIEKEN u.Mitarb.:
Zur cytochemischen Lokalisation einiger Glykosi-
dasen und anderer saurer Hydrolasen im Resorptions-
epithel des menschlichen Dünndarms.
Klin.Wschr., 45, 383-387 (1967)
99. A.SCHÄFER, P.HÖHN:
Funktionelle Morphologie der Darmschleimhaut-
Struktur und Enzymmuster bei der Ratte.
Gastroenterologie und Stoffwechsel.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1975)

100. A.SCHAUER, E.KUZE, K.BOXLER:
Generationszyklus von 1,2-Dimethylhydrazin
induzierten Adenocarcinomen des Rattencolon.
Naturwissenschaften 58, S.221 (1971)
101. D.SCHMÄHL:
Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner
Tumoren.
2.Aufl. Editio Cantor Kg. Aulendorf (1970)
102. R.SCHOENTAL u.Mitarb.:
Gastrointestinal tumors in rats and mice
following various routs of administration of
N-Methyl-N-Nitroguanidine and N-Ethyl-N-
Nitroguanidine.
Brit.J.Cancer, 23, S.757-764 (1969)
103. R.SCHOENTAL:
Lack of correlation between the presence of
7-Methylguanine in desoxyribonucleic acid and
ribonucleic acid of organs and localisation
of tumors after single carcinogenic dose of
N-Methyl-N-Nitrosourethane.
Biochem.J., 114, S.55-56 (1969)
104. D.SCHREIBER, A.LAGEMAN, M.GEYER:
Erzeugung von Dünndarmkarzinomen bei Kanninchen
mit Methylnitrosoharnstoff.
Zentralbl.Allgem.Path.u.Path.Anat. 115, S.31-61
(1972)
105. T.K.SHNITKA:
Enzymatic histochemistry of gastrointestinal
mucous membrane.
Fed.Proc., 19, S.897-907 (1960)
106. M.SPATZ, G.LAQUEUR:
Transplacental induction of tumors in sprague
dawley rats with crude cycad material.
J.Nat.Cancer Inst., 38, S.233-239 (1967)
107. P.SPRINGER u.Mitarb.:
Die Vorstufen des 1,2 DMH-induzierten Dick- und
Dünndarmcarcinoms der Ratte.
Z.f.Krebsforsch., 74, S.236-240 (1970)
108. D.STAVROU, K.ZÄNKER, W.WEIDENBACH, M.KNEIDEL:
Bedeutung der Histopochemie und des Isoenzym-
musters der Lactatdehydrogenase für die Beur-
teilung der Dignität von Hirntumoren.
Z.f.Krebsforsch. 79, S.319 (1973)

109. W.STRAUSS:
Lysosomes, phagosomes and related particles.
Enzyme Cytology, D.B.Roodyn, S.239-319 (1967)
110. A.L.TAPPEL u.Mitarb.:
Increased lysosomal enzymes genetic muscular
dystrophy.
Arch.Biochem., 96, S.340-346 (1962)
111. A.L.TAPPEL, C.BECK, S.MAHADEVAN, R.BRIGHTWELL,
R.MELLORS, J. NDUAGUDA, C.DILLAED:
Fed.Proc.Fed.Am.Soc.Ex. Biol., 26, S.797 (1967)
112. E.THOMAS:
Histotopochemie und Histopathochemie des peri-
pheren Nervensystems bei Verletzungen und Tumoren.
Enzyme Cytology, D.B.Roodyn (1967)
113. B.TOTH, R.B.WILSON:
Early vascular injury induced by 1,2-Dimethyl-
hydrazine dihydrochloride.
II.Gross and electron microscopic findings.
Arch.Path., 93, S.427-434 (1972)
114. J.S.TRIER, C.E.RUBIN:
Electronmicroscopy of the small intestine:
A review.
Gastroenterology 40, S.574-603 (1963)
115. E.S.VESSELL, A.G.BEARN:
Localisation of lactic acid dehydrogenase activity
in serum fractions.
Proc.Exp.Biol.Med. (N.Y.), 94, S.96 (1957)
116. J.H.WEISBURGER:
Colon carcinogens: Their metabolism and mode
of action.
Cancer 28, S.60-70 (1971)
117. O.WARBURG, S.MINAMI:
Versuche an überlebenden Carcinomgeweben.
Klin.Wschr. 1, S.776 (1923)
118. O.WARBURG, F.WIND, E.NEJELEIN:
Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper.
Klin.Wschr. 5, S.829 (1926)
119. O.WARBURG, W.CHRISTIAN:
Biochem.Z., 314, S.149 (1943)
120. G.M.WHITING:
Econ.Botany, 17, S.271 (1963)

121. B.WIEBECKE, U.LOEHR, A.BRANDTS, M.EDER:
Vergleichende tierexperimentelle und biopsische
Untersuchungen zur Morphogenese der Dickdarm-
polypen.
Verh.dtsch.Gescht.f.Path. 53, S.239 (1969)
122. R.J.WIEME:
Nomenclature of so-called Isoenzymes.
Lancet II, S. 352 (1959)
123. T.WIELAND, G.PFLEIDERER, K.RAJEWSKI:
Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydro-
genasen. V.Papierelektrophoretischer Vergleich
der tryptischen Spaltprodukte.
Z.Naturforsch., 15 b, S.434 (1961)
124. R.M.WILLIAMS, F.BECK:
Demonstration of alkaline phosphatase in the
lysosomes neonate rat ileum.
Histochem.J. 1, S.531-538 (1969)
125. D.E.WILLIAMS, R.A.REISFELD:
Disc-electrophoresis in polyacrylamide gels:
Extension to new conditions of pH and buffer.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 121,2, S.373 (1964)
126. S.L.WISSIG, D.O.GRANEY:
Membrane modifications in the apical endocytotic
complex of ileal epithelial cells.
J.Cell.Biol., 39, S.568-579 (1968)
127. G.WITTING, G.P.WILDNER, D.ZIEBARTH:
Der Einfluß der Ingesta auf die Kanzerisierung
des Rattendarms durch Dimethylhydrazin.
Arch.Geschwulstforsch., 37, S.105-115 (1971)
128. J.A.WITTKOP, R.A.ROUGH, D.J.REED:
Oxidative Demethylation of N-Methyl-Hydrazines
by rat liver microsomes.
Arch.Biochem.Biophys., 134, S.308 (1969)
129. D.A.WOOD:
Atlas of tumor pathology, Section 6,
Fascicle 22, S.121-184, Armed Forces
Institute of Pathology (1967)
130. S.YAMADA:
Histological and autoradiographical studies
on intestinal tumors of rat induced by oral
administration of N,N-2,7-Fluorenylenebisaceta-
mide.
Gann, 62, S.471-478 (1971)

131. M.ZALKIN u.Mitarb.:

Increased lysosomal enzymes in muscular
dystrophy of vitamine E-deficient rabbits.
J.Biol.Chem., 237, S.2672-2682 (1962)

132. J.ZELLER:

Zur Cytochemie der Lysosomen in der Ratten-
niere unter normalen und experimentellen
Bedingungen.
Histochemie 35, S.235-262 (1973)

Meinen aufrichtigen Dank gebührt Herrn
Prof.Dr.med.H.Bredt (ord.em. Professor des
Pathologischen Institutes der Universität
Mainz) sowie Prof.Dr.med.A.Schäfer und
Dr.med.P.Höhn, die mich immer hilfsbereit
mit Rat und Tat unterstützt haben.

7. Lebenslauf

Ich, Georg Brox, wurde am 12.3.1949 in Leipzig als Sohn des Internisten und Facharztes für Röntgenologie und Radiologie, Dr.med.Georg Brox und seiner Ehefrau Carola geb.Walther, geboren.

Unsere Flucht von Ostberlin nach Westberlin (November 1955) machte am Anfang meiner fünfjährigen Volksschulzeit einen dreimaligen Schulwechsel notwendig; nach der Einschulung in die Bekenntnisschule (Berlin Neukölln) zur 22. Grundschule (Berlin Hermsdorf) im zweiten Schuljahr, darauf zur 2. Grundschule in Berlin Schmargendorf. Die restlichen Volksschuljahre verbrachte ich auf der Kestnerschule in Hannover. Zu Ostern 1960 in das neusprachliche Gymnasium (Schillerschule Hannover) aufgenommen, bestand ich am 28.5.1969 die allgemeine Reifeprüfung.

Zum Wintersemester 1969/70, nach erfolgloser Bewerbung zum Medizinstudium, habe ich mich an der Christian-Albrechts Universität Kiel als stud.rer.nat. für die Fächer Biologie, Physik und Chemie immatrikuliert. Zwei Semester lang habe ich die für das Medizinstudium notwendigen Vorlesungen und Praktika belegt und testiert. Nach offizieller Zulassung zum Medizinstudium im Wintersemester 1970/71 und rückwirkender Anerkennung meines naturwissenschaftlichen Studiums, habe ich im Anschluß des Wintersemesters 1970/71 die naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum) abgelegt und vollständig bestanden. Nach dem Wintersemester 1971/72 habe ich die ärztliche Vorprüfung abgelegt und vollständig bestanden.

Nach einem weiteren klinischen Semester an der Christian-Albrechts Universität kam ich an die Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Wintersemester 1972/73).

Zum Sommersemester 1975 beabsichtige ich das medizinische Staatsexamen (ärztliche Hauptprüfung) abzulegen.

Am 13.4.1974 heiratete ich die Fachschulstudentin der Sozialpädagogik Birgitta Törner aus Eskilstuna (Schweden).

